



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DE CIRCOVIROSE EM EXPLORAÇÕES INTENSIVAS DE SUÍNOS

JOÃO ARTUR CALADO LOPES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Dr. Miguel Saraiva Lima

Dra. Ana Duarte

ORIENTADOR  
LUÍS SERRAZINA

CO-ORIENTADOR  
CARLOS MARTINS

2009

LISBOA

---



## **AGRADECIMENTOS**

A presente Dissertação de Mestrado Integrado, representa o culminar de seis anos de trabalho ao longo dos quais muitos foram os que contribuíram para que este chegasse a bom porto. A todos, gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, aos meus Pais, a quem devo tudo o que sou e tenho, pelo tempo, dedicação, paciência e compreensão que sempre manifestaram.

Ao meu orientador, Doutor Luís Serrazina, pelo vasto conhecimento partilhado, técnico e não só, pelo apoio desde a primeira hora nos trabalhos apresentados neste estudo, e, principalmente, pelo companheirismo que sempre demonstrou e que facilitou todo o processo de aprendizagem e integração no sector.

Ao Professor Doutor Carlos Martins, meu co-orientador, por toda a disponibilidade e paciência, e pelo precioso contributo na redacção desta dissertação, sem o qual esta não seria possível.

Ao Doutor Lopes Jorge, director de marketing e serviços técnicos de ruminantes e suínos da MERIAL, pelo apoio incondicional que manifestou em apoiar quer financeiramente, quer com os seus conhecimentos técnicos, o presente estudo e pela sua constante disponibilidade.

A todos os amigos e companheiros da caminhada da FMV que sempre estiveram ao meu lado, tanto nos momentos de diversão como nos momentos mais difíceis.

À minha família, com uma palavra especial para o meu tio António e a minha tia Lurdes, que facilitaram imenso a adaptação à nova realidade de estudante numa cidade distante.

A todos os amigos de Alcobaça que sempre me incentivaram e apoiaram nesta caminhada.

Por fim, gostaria também de agradecer a todos os colegas veterinários de suínos pelo companheirismo e pela forma calorosa como me receberam no sector, deixando a vontade de continuar e fazer mais pela suinicultura em Portugal.

# ESTUDO DE CIRCOVIROSE EM EXPLORAÇÕES INTENSIVAS DE SUÍNOS

## Resumo

O agente etiológico da circovirose é um vírus de pequenas dimensões, sem envelope, de simetria icosaédrica, contendo um genoma DNA de cadeia circular simples, ao qual se deu o nome de *Porcine circovirus* (PCV). O PCV é considerado um vírus ubiquitário, que causa doença exclusivamente em suínos e já foi isolado em todos os continentes. Este vírus é responsável por várias afecções, sendo a mais comum e responsável por maiores perdas económicas no sector, a síndrome de emagrecimento pós-desmame (PMWS).

Existem diversos factores de risco para que se verifique manifestação clínica de doença, nomeadamente deficiências de manejo, a presença de co-infecções, estatuto imunitário das reprodutoras contra o PCV e imuno-estimulação por diferentes causas. As lesões e sinais clínicos associados a infecção por PCV sugerem que este seja um agente imunossupressor / imunomodulador. O controlo e prevenção das PCVD passam pela minimização do efeito dos factores de risco e pela vacinação contra o PCV.

Neste contexto, o presente estudo tem como objectivos:

1. Identificar explorações intensivas de suínos com suspeita de ocorrência de PCV2.
2. Caracterizar diferentes explorações intensivas de suínos com base na avaliação de medidas gerais de manejo, biossegurança, vacinação e outros tratamentos.
3. Identificar animais com suspeitas de doença nas explorações avaliadas e proceder ao seu diagnóstico.
4. Avaliar a transferência de imunidade contra PCV2, por reprodutoras vacinadas para leitões.
5. Implementar medidas correctivas das anomalias identificadas.

No trabalho I foram seleccionadas diversas explorações intensivas de suínos onde se procedeu ao diagnóstico de PMWS através de avaliação de sinais clínicos, lesões microscópicas e detecção do vírus por hibridação *in situ*. Em quatro das sete explorações avaliadas obtiveram-se resultados positivos, mas em apenas uma delas foi aconselhada a implementação de medidas de controlo da infecção por PCV, nomeadamente através de vacinação.

No trabalho II foram seleccionadas duas explorações intensivas de suínos onde se realizava a vacinação das reprodutoras com CIRCOVAC®. Realizaram-se provas de serologia, segundo protocolo da MERIAL, para avaliar a transferência de imunidade das reprodutoras para a sua descendência. Em oposição à homogeneidade observada nos títulos de anticorpos das porcas da exploração 2, na exploração 1, 20% das reprodutoras apresentavam títulos baixos de anticorpos vacinais. Por tal motivo, aconselhou-se a reavaliação do plano de vacinação de modo a minimizar as falhas vacinais e maximizar a imunidade pós-vacinal.

Palavras-chave: suíno; circovírus; diagnóstico; sistema imune; manejo; vacinação

## STUDY OF CIRCOVIROSIS IN INTENSIVE PIG FARMS

### Abstract

The etiological agent of circovirus is a small icosahedral, non-enveloped virus, containing single-stranded, circular DNA genome, which was named porcine circovirus (PCV). The PCV is considered a ubiquitous virus, that causes disease only in pigs and has been isolated on all continents. This virus is responsible for various diseases, with the most common and responsible for major economic losses of them being, the post- weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).

There are several risk factors for which there is manifestation of clinical disease, including deficient management, presence of co-infections, immune status of the sow against PCV and immune-stimulation by different causes. The clinical signs and lesions associated with PCV infection suggest that this agent is an immunosuppressant / immunomodulator. The control and prevention of PCVD is focused in the minimization of the effect of risk factors and vaccination against PCV.

In this context, this study aims to:

1. Identify intensive pig farms with suspicion of PCV2.
2. Characterize different intensive pig farms based on management, biosecurity, vaccination and other treatments.
3. Identify animals suspected of disease on evaluated farms and proceed to diagnosis.
4. Evaluate the transfer of immunity against PCV2 by vaccinated sows to breeding.
5. Implement corrective action of deficiencies identified.

In work I several intensive pig farms were selected and diagnosed to PMWS through evaluation of clinical signs, microscopic lesions and detection of virus by *in situ* hybridization. In four of the seven farms evaluated, positive results were obtained, but only one was advised to implement measures for the control of PCV infection, particularly through vaccination.

In Work II two intensive pig farms were selected, where the sows were vaccinated with CIRCOVAC ®. Serology was made, by blocking ELISA, according to Merial's protocol, to evaluate the transfer of immunity from sows to their offspring. In contrast to the homogeneity observed in the antibody titers of sows of farm 2, in farm 1, 20% of the sows had low antibody titres from vaccine. Therefore a reassessment of the vaccination program was advised to minimize the vaccine failures and to maximize immunity post-vaccination.

Keywords: swine; circovirus, diagnosis, immune system, management, vaccination.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO .....	3
2. CIRCOVIROSE .....	4
2.1. BREVE RESUMO HISTÓRICO DA CIRCOVIROSE .....	4
2.2. ETIOLOGIA .....	6
2.2.1 Características gerais e Taxonomia.....	6
2.2.2. Morfologia e organização genómica.....	7
2.2.3. Propriedades biológicas e físicas .....	8
2.2.3.1. Diferenças de virulência entre génotipos virais .....	8
2.2.4. Doenças causadas pelo circovírus porcino (PCVD) .....	9
2.3. EPIDEMIOLOGIA DO PCV2 E PMWS .....	10
2.3.1. Distribuição geográfica .....	10
2.3.2. Espécies susceptíveis .....	12
2.3.2.1. Susceptibilidade de raças suínas .....	13
2.3.3. Vias de transmissão.....	13
2.3.3.1. Horizontal .....	13
2.3.3.2. Vertical.....	14
2.3.4. Factores de risco.....	15
2.3.4.1. Deficiências de manejo .....	15
2.3.4.2. O estatuto imunitário e infeccioso da porca face ao PCV2.....	16
2.3.4.3. Co-infecções.....	16
2.3.4.4. Efeito da imuno-estimulação no desenvolvimento de PMWS.....	18
2.4. PATOGENIA .....	20
2.4.1. Dinâmica da infecção.....	21
2.4.2. Carga viral.....	21
2.4.3. Imunologia .....	22
2.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	25
2.5.1. PMWS.....	25
2.5.1.1. Sinais clínicos .....	25
2.5.1.2. Lesões macroscópicas .....	25
2.5.1.3. Lesões microscópicas.....	26
2.5.2. PDNS .....	28
2.5.2.1. Sinais clínicos .....	29
2.5.2.2. Lesões macroscópicas .....	29
2.5.2.3. Lesões microscópicas.....	29
2.5.3. Pneumonia necrosante proliferativa (PNP).....	30
2.5.4. Enterite associada a PCV2 .....	30
2.5.5. Falhas reprodutivas .....	31
2.5.6. Tremores congénitos .....	31
2.6. DIAGNÓSTICO.....	32
2.6.1. Diagnóstico de exploração .....	32
2.6.2. Diagnóstico individual .....	32
2.6.3. Diagnóstico diferencial .....	34
2.6.4. Técnicas de diagnóstico .....	35
2.6.4.1. Métodos de detecção de ácido nucleico e antígeno viral de PCV2 .....	35
2.6.4.1.1. PCR .....	36

2.6.4.1.2. ISH e IHC .....	36
2.6.4.1.3. Isolamento do vírus .....	37
2.6.4.2. Métodos de detecção de anticorpos .....	37
2.6.4.2.1. ELISA .....	37
2.7. PREVENÇÃO E CONTROLO .....	39
2.7.1. Maneio .....	39
2.7.2. Controlo de co-infecções .....	42
2.7.3. Nutrição .....	43
2.7.4. Alteração da linhagem genética .....	43
2.7.5. Seroterapia .....	43
2.7.6. Vacinação .....	43
3. OBJECTIVOS .....	45
4. TRABALHO I – DIAGNÓSTICO DE PCV2 EM EXPLORAÇÕES INTENSIVAS DE SUÍNOS.....	46
4.1. METODOLOGIA .....	46
4.1.1. Identificação de explorações com suspeita de doença.....	46
4.1.2. Localização geográfica e parâmetros de caracterização das explorações .....	46
4.1.3. Selecção de suínos suspeitos .....	48
4.1.4. Amostragem de suínos do estudo .....	48
4.1.5. Colheita e envio de amostras para o laboratório.....	49
4.1.6. Descrição sumária da técnica de ISH .....	50
4.2. RESULTADOS .....	51
4.2.1. Caracterização das explorações seleccionadas .....	51
4.2.2. Resultados da prova ISH e avaliação do quadro lesional microscópico .....	53
4.2.2.1. Exploração A .....	53
4.2.2.2. Exploração B .....	53
4.2.2.3. Exploração C .....	53
4.2.2.4. Exploração D .....	53
4.2.2.5. Exploração E .....	54
4.2.2.6. Exploração F .....	54
4.2.2.7. Exploração G .....	54
4.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	55
5. TRABALHO II – BREVE ESTUDO SOBRE TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE DE REPRODUTORAS VACINADAS (CIRCOVAC®) À DESCENDÊNCIA.....	58
5.1. INTRODUÇÃO .....	58
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	59
5.3. RESULTADOS .....	60
5.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64
BIBLIOGRAFIA .....	65
ANEXOS.....	71
ANEXO I.....	72
DESCRIÇÃO DETALHADA DAS EXPLORAÇÕES ENVOLVIDAS NO TRABALHO I	72
EXPLORAÇÃO A.....	73
EXPLORAÇÃO B .....	74
EXPLORAÇÃO C .....	75
EXPLORAÇÃO D.....	76

EXPLORAÇÃO E.....	77
EXPLORAÇÃO F.....	78
EXPLORAÇÃO G.....	79
ANEXO II.....	80
PROTOCOLO DE ELISA POR BLOQUEIO.....	80

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Evolução do efectivo suíno em diferentes continentes e a nível mundial.....	1
Tabela 2: Registo de PMWS e identificação de PCV2 na Ásia.....	10
Tabela 3: Resumo da situação actual de PMWS em alguns países Europeus.....	11
Tabela 4: Medidas de maneio que influenciam o risco de desenvolvimento de PMWS.....	14
Tabela 5: Distribuição e frequência da detecção de ácido nucleico de PCV2 por ISH em diferentes tecidos.....	19
Tabela 6: Frequência de lesões macroscópicas observadas em 396 suínos com PMWS.....	25
Tabela 7: Frequência de lesões microscópicas observadas em 396 suínos com PMWS.....	27
Tabela 8: Plano dos 20 princípios de Madec.....	39
Tabela 9: Características das vacinas comerciais contra PCV2.....	43
Tabela 10: Caracterização das explorações envolvidas no trabalho I.....	46
Tabela 11: Parâmetros utilizados na caracterização das explorações.....	47
Tabela 12: Caracterização das explorações seleccionadas.....	52
Tabela 13: Resultados da prova de ISH.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: N° de casos de PCVD identificados no Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory.....	5
Figura 2: Géneros e espécies incluídas na família <i>Circoviridae</i> .....	6
Figura 3: Representação esquemática do genoma do PCV2 mostrando a posição e sentido de transcrição das ORF.....	7
Figura 4: Países onde foi diagnosticado PMWS.....	10
Figura 5: Co-infecções em casos de PMWS.....	16
Figura 6: Distribuição geográfica das explorações estudadas.....	45
Figura 7: Pistola de sacrifício.....	47
Figura 8: Exemplo de animal seleccionado com 8 semanas, com suspeita de PMWS.....	48
Figura 9: Carcaça de suíno após rebatimento dos membros e exposição das cavidades torácica e abdominal.....	49
Figura 10: Linfonodo de suíno com infecção natural de PCV2.....	51
Figura 11: Níveis de anticorpos contra PCV em reprodutoras da exploração 1.....	60
Figura 12: Níveis de anticorpos contra PCV em leitões da exploração 1.....	61
Figura 13: Níveis de anticorpos contra PCV em reprodutoras da exploração 2.....	61
Figura 14: Níveis de anticorpos contra PCV em leitões da exploração 2.....	62



## ABREVIATURAS

App. - *Actinobacillus pleuropneumoniae*

CD – Células Dendríticas

IFI – Imunofluorescência indirecta

IHC – Imunohistoquímica

IPMA – teste de imunoperoxidase em monocamada

ISH – Hbridação *in situ*

M. hyo. – *Mycoplasma hyopneumoniae*

NIPC – natural interferon-producing cell

ORF – Fragmentos de leitura aberta

PAMP – Pathogen-associated molecular pattern

PCV – Circovírus porcino

PCV1 – Circovírus porcino tipo 1

PCV2 – Circovírus porcino tipo 2

PCVAD – Doenças associadas ao PCV2

PCVD – Doenças causadas pelo PCV2

PDNS – Síndrome de nefropatia e dermatite porcina

PMWS – Post-weaning multisystemic wasting syndrome (Síndrome de emagrecimento pós-desmame)

PNP – Pneumonia necrosante proliferativa

PPV – Parvovírus suíno

PRDC – Doenças do complexo respiratório suíno

PRRS – Síndrome respiratório e reprodutivo porcino

PRRSV – Vírus do síndrome respiratório e reprodutivo porcino

SI – Influenza suína



# 1. INTRODUÇÃO

A produção e comércio de carne de suíno registaram, a nível mundial, um forte crescimento nas últimas décadas. No entanto, em 2008, o sector foi afectado por uma forte crise, principalmente na Europa e América do Norte, devido ao aumento do preço dos cereais, matéria-prima essencial no fabrico de rações, e à diminuição do preço da carne de suíno ao nível dos matadouros.

As previsões da FAO apontam para um aumento da produção global de carne de suíno em 2009, ligeiramente acima do nível 2008 – 101 milhões de toneladas, sendo que o incremento esperado na Ásia pode ser compensado por uma contracção da produção na América do Norte. Na Europa, a Federação da Rússia pode registar um crescimento na ordem dos 7% em 2009, reflectindo o apoio governamental e as políticas destinadas a fomentar a qualidade e a produção interna para reduzir a dependência das importações. No entanto, os reduzidos inventários de suínos na União Europeia indicam uma estagnação da produção.

Estima-se que o comércio mundial de carne de suíno deva permanecer na ordem de 5,8 milhões toneladas em 2009. A China, que foi o grande importador em 2008, deve reduzir as suas compras em 2009, resultado da recuperação da produção. Ainda assim estas permanecerão elevadas, em torno de 450.000 toneladas. O sector suinícola na União Europeia está em reestruturação desde 2008, o que deve resultar em diminuição tanto no abastecimento como nas exportações em 2009. A evolução do efectivo suíno nos últimos anos é apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Evolução do efectivo suíno em diferentes continentes e a nível mundial (milhões de cabeças) (fonte: FAOSTAT).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<b>África</b>	19,57	20,07	21,41	21,46	22,37	23,60	24,23	25,20
<b>América do Sul</b>	47,61	49,38	48,65	48,72	50,19	52,04	55,72	56,03
<b>América do Norte</b>	72,24	72,71	74,09	74,29	75,16	75,78	76,56	76,76
<b>Europa</b>	200,34	192,43	194,72	197,91	192,35	190,77	193,52	198,04
<b>Ásia</b>	528,99	517,61	524,08	525,98	524,45	534,23	547,53	535,07
<b>Mundo</b>	895,73	880,32	889,11	894,00	890,80	903,10	924,30	918,27

Num sector em que a optimização dos custos de produção é a chave do sucesso, o controlo de afecções que diminuam a “performance” dos animais representa um papel importante.

Na actualidade, observa-se a emergência ou re-emergência de alguns vírus que afectam explorações suinícolas. O aumento da importância no sector suinícola destes novos agentes fica a dever-se, na opinião de John Gadd (2006), a três razões principais:

- O uso, por parte dos produtores, de métodos antiquados para estabelecer a imunidade natural nas suas porcas, que não proporcionam, particularmente nas porcas de reposição, tempo suficiente para a aquisição de imunidade natural contra estes novos vírus, nem para que essa imunidade possa ser transferida para a sua descendência sob a forma de anticorpos maternos.
- A dificuldade em eliminar os vírus mais recentemente identificados através do uso dos desinfectantes tradicionais com as diluições habituais.
- O facto de estes vírus encontrarem na matéria orgânica um refúgio, que lhes proporciona protecção contra o efeito de destruição dos desinfectantes. O problema da eliminação de toda a quantidade de detritos fecais pode proteger os vírus permitindo que estes sobrevivam nas superfícies dos alojamentos, equipamentos, botas e viaturas de transporte.

Muitas das explorações não actualizaram o seu maneio nestas áreas de trabalho e, como consequência, estes vírus estão a ganhar terreno nas explorações pecuárias.

Um desses vírus é o circovírus porcino (PCV) que é responsável por aumento de mortalidade na recria e engorda, aumento do número de animais refugados, atraso de crescimento e resistência a antibioterapia. Estas alterações causam avultados prejuízos nas explorações afectadas, pelo que se torna vital a identificação e controlo da infecção por parte deste agente. Regista-se uma diminuição de 34% nas margens de lucro em leitões, comparando antes e depois de o PCV causar doença numa exploração. Este valor representa, sensivelmente, 4€ de prejuízo por animal vendido (Hardge, Gaumann, Hasberg & Lange, 2003) o que, por exemplo, numa exploração de 200 reprodutoras (mínimo 4000 animais por ano), representa um prejuízo de 16.000€/ano, causado pelo PCV.

Tendo em conta estes dados, é de extrema importância compreender, diagnosticar e controlar este vírus, de forma a minimizar o seu impacto nas explorações intensivas de suínos.

## **1.1. BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO**

No âmbito do estágio relativo ao Mestrado em Medicina Veterinária foram realizadas diversas actividades.

A principal área de actividade foi a assistência veterinária a explorações intensivas de suínos. Dentro desta área foram desenvolvidas diversas actividades, nomeadamente diagnósticos de gestação com recurso a ecógrafo portátil, colheitas de sangue no âmbito do plano nacional de erradicação da doença de Aujeszky e para a realização de diagnóstico ou verificação da dinâmica de infecção de outras patologias. Foram realizadas diversas necrópsias, re-avaliados planos de vacinação, alteradas ou instauradas diversas antibióterapias e sugeridas diversas alterações de manejo e instalações. As questões de biossegurança foram uma prioridade, uma vez que muitos produtores estão pouco sensibilizados para esta questão.

De forma a controlar e avaliar algumas patologias, foram acompanhados alguns abates de animais das explorações às quais se prestava assistência.

Foram também desenvolvidas actividades de apoio a uma fábrica de ração nomeadamente através de visitas a várias explorações de suínos e de coelhos. Na área de produção de coelhos, a actividade foi reduzida e passou por algumas necrópsias e colheita de material para análise e posterior aconselhamento aos produtores.

## 2. CIRCOVIROSE

### 2.1. BREVE RESUMO HISTÓRICO DA CIRCOVIROSE

Em 1974, foi descrito por Tischer um novo vírus, como um contaminante não-citopatogénico de uma cultura de células de rim suíno PK-15, semelhante ao picornavírus. Em 1982, este vírus de pequenas dimensões, sem envelope, de simetria icosaédrica, contendo um genoma de DNA de cadeia circular simples, ao qual se deu o nome de *Porcine circovirus* (PCV), foi caracterizado como um novo vírus de mamíferos (Allan & Ellis, 2000). Em condições experimentais, o PCV isolado nas células PK-15 foi incapaz de reproduzir doença em suínos (Allan et al., 1995).

No ano de 1991 um veterinário canadiano, Dr. John Harding, observou um grupo de animais da recria que apresentavam marcado emagrecimento, dificuldades respiratórias, palidez e icterícia, com mortalidades que rondavam os 12-15%. Seleccionou alguns dos animais e enviou-os para necrópsia na Universidade de Saskatchewan (Canadá). O estudo realizado pelo Dr. Edward Clark revelou a presença de lesões microscópicas no sistema linfóide (depleção linfocitária e infiltração granulomatosa dos tecidos linfóides), de origem desconhecida, presentes em todos os suínos (Segalés, 2007).

Pouco tempo depois, em 1994, um surto de uma doença inflamatória sistémica progressiva com evolução subaguda a crónica, com elevadas taxas de mortalidade e afectando principalmente leitões desmamados, foi descrito no Canadá em várias explorações de elevado estatuto sanitário. O facto de as explorações onde surgiu este surto serem livres de Síndrome Respiratório e Reprodutivo Porcino (PRRS) e da maioria dos principais agentes patogénicos respiratórios e entéricos levou a crer que se trataria de um agente não conhecido. Desde cedo se suspeitou de etiologia viral, em grande parte devido a presença de corpos de inclusão basofílicos nas células inflamatórias granulomatosas. A apresentação clínica da doença na sua forma epidémica era de tal forma característica que surgiu em 1996 o termo *post-weaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS), síndrome de emagrecimento pós-desmame, de modo a realçar as suas manifestações clínicas mais evidentes, nomeadamente a ocorrência de uma afecção com envolvimento de múltiplos órgãos em leitões entre 8 e 12 semanas de idade cujo sinal clínico mais evidente era um progressivo emagrecimento, sendo os animais incapazes de prosseguir o seu normal crescimento (Clark, Ellis, Allan & Krakowka, 2004).

Em 1998, Hamel, Lin e Nayar descreveram toda a sequência genómica do PCV associado ao PMWS e concluíram que esta variante do vírus apresentava diferenças em relação ao PCV não patogénico isolado nas células PK-15 (68% de homologia). De forma a distinguir ambos os vírus, o PCV patogénico associado a PMWS foi denominado circovírus porcino tipo 2

(PCV2), enquanto que o PCV não patogénico passou a ser conhecido como circovírus porcino tipo 1 (PCV1) (Meehan et al., 1998). O PCV1 e o PCV2 são actualmente identificados pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus como duas espécies diferentes do género *Circovirus*.

O PCV2 é actualmente reconhecido como um agente patogénico emergente que afecta o sector suinícola desde a década de 90. No entanto, tanto o agente PCV2 como a sua manifestação clínica mais comum, PMWS, já estavam presentes na população suína muito antes de serem identificados pela primeira vez.

Um estudo retrospectivo realizado por Jacobsen (2009) e colaboradores sobre a ocorrência de PCV2 e lesões associadas revelou que o vírus está presente na população suína Alemã desde, pelo menos, 1962 (data mais antiga em que o vírus foi isolado). Ainda neste estudo foi possível verificar a presença de casos isolados de PMWS em 1985, sendo esta a data mais antiga em que foi possível detectar lesões associadas a PCV2. A informação recolhida neste estudo permitiu também observar um aumento significativo na incidência da infecção por PCV2, sendo que, no período compreendido entre 1962 e 1984 essa incidência era de 2,77%, enquanto que, no período entre 1985 e 1998, era de 32,14%.

Noutro estudo semelhante realizado no México, efectuaram-se análises serológicas em 659 amostras de soro colhidas neste país entre 1972 e 2000 através de um teste de imunoperoxidase em monocamada (IPMA). A prevalência global de anticorpos contra PCV-2, entre as amostras incluídas no estudo, foi de 59% (387/659). No período compreendido entre 1972 e 1979, a prevalência observada foi de 27% (24/90), enquanto que, para o período de 1980 a 1989, foi de 44% (74/169). Finalmente, as amostras relativas ao período 1990-2000 registaram uma prevalência de 72% (289/400). Este estudo mostra evidência de infecção de PCV2 no México muitos anos antes da primeira descrição de PMWS no país (2001), o que suporta os resultados obtidos noutras partes do mundo. Até à data, este estudo fornece a evidência mais antiga de infecção por PCV2 no continente americano (Ramírez-Mendoza, Castillo-Juárez, Hernández, Correa & Segalés, 2009).

Este aumento de prevalência da infecção também foi verificado nos Estados Unidos, onde análises laboratoriais realizadas pelo Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory revelaram um marcado aumento de doenças causadas pelo PVC2 (PCVD) no ano de 2006, como descrito na figura 1 (Opriessnig, Meng & Halbur, 2007).

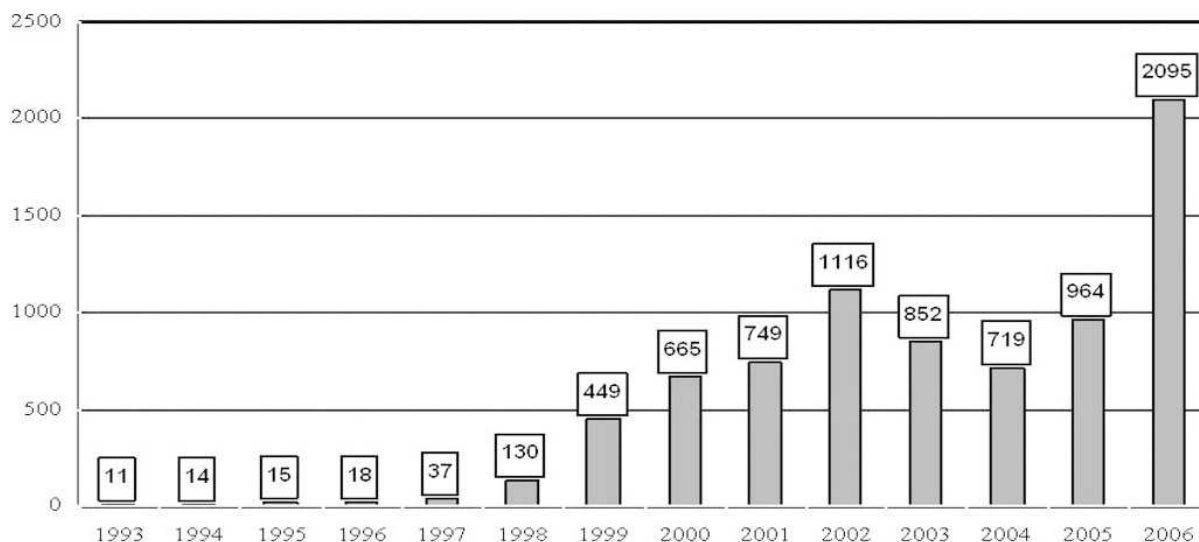


Figura 1. N° de casos de PCVD identificados no Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory (Adaptado de: Opriessnig et al., 2007).

## 2.2. ETIOLOGIA

### 2.2.1 Características gerais e Taxonomia

O PCV1 e o PCV2 pertencem à família *Circoviridae* (*circo* = circular), uma das 64 famílias de vírus existentes. Este é um grupo único de vírus no sentido em que são os vírus mais pequenos conhecidos com capacidade de replicação autónoma. Os vírus pertencentes a esta família possuem viriões sem envelope e com simetria icosaédrica entre 17 a 22 nm de diâmetro. O DNA viral é constituído por uma cadeia única de forma circular, característica que permite distingui-los dos demais vírus (Clark et al., 2004). De acordo com o Comité Internacional de Taxonomia Viral, esta família é constituída por dois géneros (figura 2): *Circovirus* (*Circo* indica a forma do genoma viral) e o *Gyrovirus* (*gyro* deriva do grego *gyrus* que significa “anel” ou “circuito”). No género *Circovirus*, actualmente existem as espécies PCV1, PCV2, vírus da doença do bico e das penas, circovírus do canário (CaCV), circovírus do pato (DuCV), circovírus do tentilhão (FiCV), circovírus do ganso (GoCV), circovírus da gaivota (GuCV), circovírus do pombo (PiCV) e o circovírus do estorninho (StCV). No género *Gyrovirus*, apenas uma espécie é conhecida, o vírus da anemia da galinha (CAV).



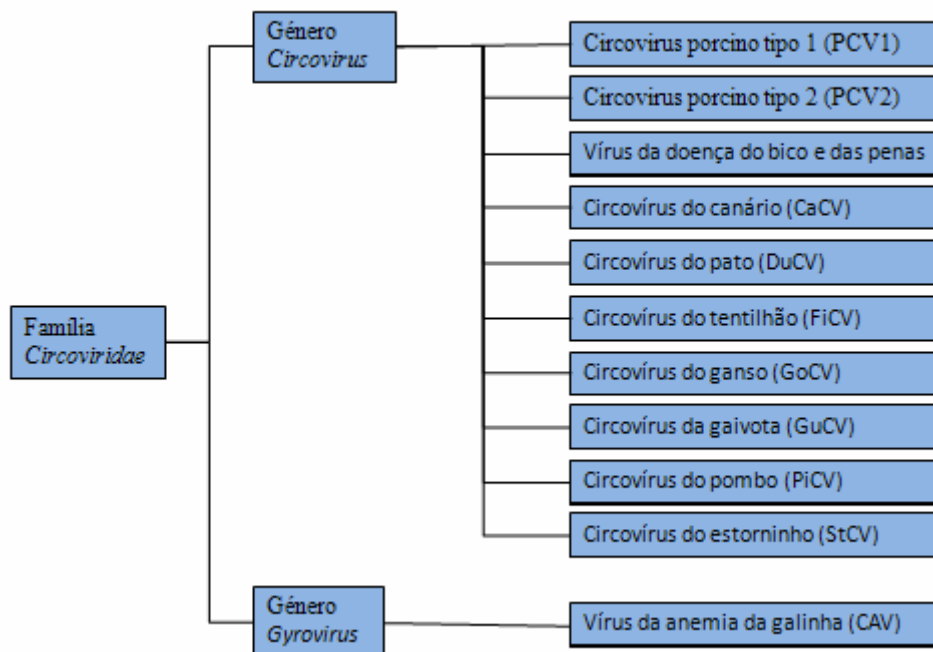


Figura 2. Gêneros e espécies incluídas na família *Circoviridae* (Adaptado de [www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)).

### 2.2.2. Morfologia e organização genômica

A morfologia e tamanho dos viriões de PCV1 e de PCV2 são semelhantes. São constituídos por uma cadeia simples de DNA circular, envolvida por uma cápside proteica. A cápside possui simetria icosaédrica, não possui envelope e mede cerca de 17 nm de diâmetro. O PCV2 possui 1767-1768 nucleótidos de comprimento (Meehan et al., 1998).

Existem várias pequenas inserções e deleções localizadas ao longo de todo o genoma que sugerem ser responsáveis pelas diferenças de patogenicidade entre PCV1 e o PCV2. Foram sugeridos até 11 fragmentos de leitura aberta (ORFs) para o genoma do PCV1 e PCV2 (Meehan et al., 1998). No entanto, apenas ORF1 e ORF2 são expressas em ambos os vírus. A ORF1 é constituída por cerca de 940 nucleótidos de comprimento e codifica duas proteínas essenciais à replicação viral: as replicases Rep e Rep'. O ORF2 tem cerca de 701 nucleótidos de comprimento e codifica uma proteína da cápside (Cap). A esquematização do genoma do PCV2 com a representação das ORF pode ser observada na figura 3.

Aparentemente, os genes Rep, Rep' e Cap são os únicos envolvidos no ciclo replicativo do vírus. No entanto, uma proteína codificada pela ORF3 também foi identificada no PCV2 e parece ter um papel importante na patogênese viral. Estudos mostram que a proteína codificada pela ORF3 é dispensável para a replicação viral e parece estar envolvida na apoptose celular (Liu, Chen, Du, Chua & Kwang, 2006).

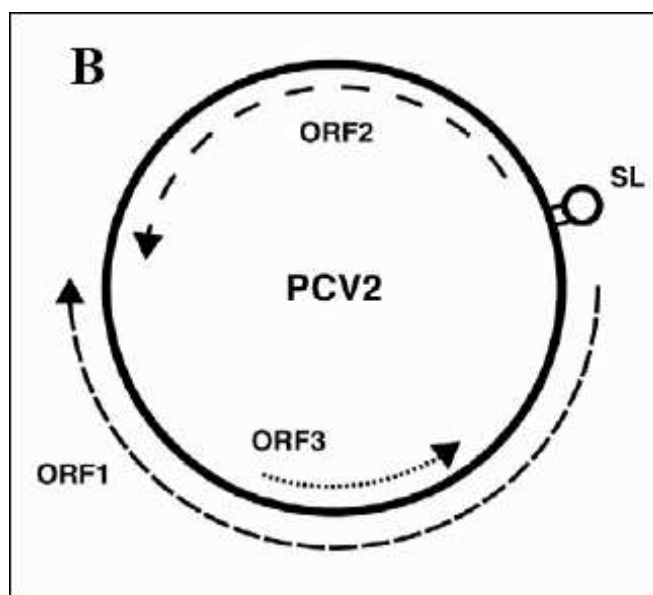


Figura 3. Representação esquemática do genoma do PCV2 mostrando a posição e sentido de transcrição das ORF. (Adaptado de Meehan et al., 1998).

### 2.2.3. Propriedades biológicas e físicas

O PCV1 é estável a pH=3, a 56°C e a 70°C, durante 15 minutos, e é resistente a inactivação após a exposição ao clorofórmio. Existe uma grande probabilidade de que estas características sejam comuns para ambos os PCV, tendo em conta a sua grande similitude morfológica e genética. A capacidade de infecção por parte do PCV2 foi reduzida em 1,6log através de pasteurização durante 10 horas a 60°C, em 0,75log por tratamento térmico seco durante 72 horas a 80°C, e em 1,25log por tratamento com calor seco extremo durante 30 minutos a 120°C (Opriessnig et al., 2007). Estudos revelam que os PCVs podem ser inactivados por desinfetantes alcalinos (hidróxido de sódio), por agentes oxidantes (hipoclorito de sódio) e por amónio quaternário ou fenol. O PCV2 resiste à acção de uma série de desinfetantes comerciais com base em álcool, clorohexidina ou iodo. (Royer, Nawagitgul, Halbur & Paul, 2001; Martin, Le Potier & Maris, 2008).

#### 2.2.3.1. Diferenças de virulência entre genótipos virais

O facto do PCV2 ser detectado tanto em explorações afectadas por PMWS como em explorações livres levanta dúvidas quanto à possibilidade de existirem estirpes mais virulentas que outras. Esta hipótese é suportada pelo facto da infecção por PCV2 estar presente em suínos muitos anos antes da emergência do PMWS.

Recentemente, surgiu o termo genótipo, distinguindo o PCV2 genótipo 1, potencialmente mais patogénico do que o PCV2 genótipo 2 (Grau-Roma et al., 2008). Actualmente, existe

uma verdadeira controvérsia sobre este tópico uma vez que os diversos estudos nesta área mostram resultados mistos. No entanto, é necessário ter em conta que a reprodução experimental da doença pode ser feita através de ambos os genótipos, embora o PCV2 genótipo 1 tenha uma maior eficácia. (López-Soria, Grau-Roma & Segalés 2008).

Existe uma variedade de terminologia na literatura para se referir aos diferentes genótipos de PCV2. Assim, nos Estados Unidos e no Canadá a terminologia utilizada é PCV2a e PCV2b, que equivalem ao PCV2 genótipo 2 e PCV2 genótipo 1, respectivamente, terminologia utilizada na Europa.

#### **2.2.4. Doenças causadas pelo circovírus porcino (PCVD)**

Além do PMWS várias doenças foram associadas ao PCV2 e, actualmente, são conhecidas colectivamente como doenças do circovírus porcino (PCVD), na Europa, ou como doenças associadas ao circovírus porcino (PCVAD) nos EUA. Neste grupo estão incluídos o PMWS, síndrome de nefropatia e dermatite porcina (PDNS), falhas reprodutivas, enterite associada ao PCV2, pneumonia necrosante proliferativa (PNP) e doenças do complexo respiratório porcino (PRDC).

## **2.3. EPIDEMIOLOGIA DO PCV2 E PMWS**

A manifestação clínica mais comum do PCV2, o PMWS, surgiu no Canadá em explorações de elevado estatuto sanitário (Allan et al., 1999). Estas explorações eram livres das principais afecções do trato respiratório e gastrointestinal, nomeadamente pneumonia por micoplasma, rinite atrófica, gastroenterite transmissível, doença de Aujeszky, PRRS.

A doença pode afectar qualquer tipo de exploração, desde simples engordas a explorações de ciclo completo. A síndrome foi diagnosticada tanto em explorações familiares de pequenas dimensões (50 reprodutoras) como em suiniculturas de alta produção (1200 reprodutoras) (Clark et al., 2004).

A elevada incidência de infecção em todas as populações comerciais de suínos testadas até à data e a existência de soros arquivados com 30 anos e com anticorpos para PCV2, indicam que o PCV2 não será um vírus recente, mas um vírus recentemente descoberto (Walker et al., 2000).

Estudos retrospectivos identificaram casos esporádicos e deficientemente diagnosticados de PMWS de 1986 em diante. Estes casos individuais, recentemente identificados como sendo PMWS, apresentavam lesões histológicas características associadas a abundantes cargas de antígeno viral de PCV2 (Rodriguez-Arriaga et al., 2003). Estes estudos indicam que manifestações clínicas devidas ao PCV2, em especial o PMWS, evoluíram de casos esporádicos e individuais, para epidemias globais com importante impacto económico.

O facto do PCV2 poder ser isolado a partir de suínos doentes e saudáveis, provenientes de explorações infectadas ou livres de doença, sem que haja claras diferenças de virulência entre os diferentes vírus isolados nessas explorações, permite julgar que são necessárias causas adicionais ou circunstâncias particulares que activem a replicação viral ao ponto de suplantar o sistema imunitário. (Madec, Rose, Grasland, Cariolet & Jestin, 2008)

### **2.3.1. Distribuição geográfica**

Estudos epidemiológicos revelaram que a seroprevalência do PCV2 a nível mundial é próxima de 100% nos animais em idade de abate e quase nenhuma exploração livre de anticorpos de PCV2 foi encontrada em todo o mundo (Rose et al., 2003; López-Soria et al., 2005). Consequentemente, o PCV2 é considerado ubiquitário na população suína doméstica (Allan & Ellis, 2000).

O diagnóstico para PMWS foi positivo em países dos cinco continentes, incluindo os principais países produtores de suínos (Figura 4). É de salientar a situação particular da Austrália, onde se demonstrou a presença de PCV2, sem, no entanto, serem relatados casos de PMWS, apesar de existirem registos de casos pontuais de PDNS.



Tabela 3. Resumo da situação actual de PMWS em alguns países Europeus (Adaptado de Segalés, 2006. Dados relativos ao ano de publicação do artigo).

País	1º caso	Situação actual PMWS
Dinamarca	2000	Considerado um problema muito importante durante os anos de 2002-03, mas com prevalência decrescente desde 2004.
França	1997	Principal afecção da indústria porcina até 2000-01; actualmente importância decrescente.
Alemanha	1998	Problema importante até 2003-04, mas com importância decrescente.
Irlanda	1998	Aumento de casos durante os últimos 3 anos; preocupação principal com prevalência crescente.
Itália	1998	Grande preocupação até 2003-04, mas com importância decrescente na actualidade.
Polónia	2000	Preocupação moderada com a doença, mas com importância crescente, particularmente na parte ocidental do país.
Portugal	2000	Principal afecção da indústria porcina até 2004; importância decrescente.
Espanha	1997	Principal preocupação da indústria porcina até 2004; importância decrescente a nível nacional.
Holanda	1998	Principal preocupação da indústria porcina até 2004; importância decrescente.
Reino Unido	1998	Principal preocupação mas com aparente declínio da prevalência. Pouco significativo na Irlanda do Norte.

### 2.3.2. Espécies susceptíveis

O PMWS é uma doença que afecta exclusivamente suínos. Outras espécies pecuárias (bovinos, caprinos e ovinos) não revelaram qualquer tipo de infecção por PCV2. O mesmo se verificou em cavalos, cães, gatos, ratos e humanos. Estas espécies animais não são susceptíveis de infecção por PCV2 e, portanto, não representam perigo epidemiológico (Rodríguez-Arriaga et al., 2003).

Todas as raças de *sus domesticus* são susceptíveis à infecção por PCV2. No caso do javali (*sus scrofa*), diversos estudos foram publicados que comprovam a presença de PCV2 nesta espécie. John Ellis e colaboradores (2003) reportaram a presença de doença multisistémica num grupo de javalis Euroasiáticos criados em liberdade. Os leitões afectados apresentavam

pneumonia, enterite e estavam caquéticos. PCV2 foi identificado nos tecidos afectados por imunohistoquímica (IHC) e hibridação *in situ* (ISH). A ORF2 do PCV2 isolado nestes suínos tinha 97,8% de homologia com o isolado de referência de PCV2.

Num outro estudo realizado em Itália entre Maio de 2002 e Julho de 2004 foram colhidas amostras de 795 javalis do parque regional de Gessi Bolognesi. Usando um teste de ELISA competitivo baseado em anticorpos monoclonais, os resultados obtidos revelaram que 374 (47%) amostras foram positivas para PCV2. A elevada prevalência de anticorpos contra PCV2 sugere que a infecção seja endémica na população estudada e confirma a infecção por PCV2 dos javalis na Europa (Delogu et al., 2005).

### **2.3.2.1. Susceptibilidade de raças suínas**

As observações de veterinários e de produtores levam a crer que existe uma susceptibilidade variável ao PMWS dependendo da linha do varrasco utilizado.

Um estudo de campo relata uma grande diferença na mortalidade na recria devida a PMWS em leitões provenientes de varrascos resultantes de um cruzamento Large White – Duroc (26,3%) em comparação com os leitões de varrascos Large White – Pietrain (5,9%) e leitões provenientes de varrascos de raça Pietrain pura (até 2,1 %) (López-Soria et al., 2004).

Uma investigação em que se realizou uma infecção experimental com PCV2 concluiu que existiam diferenças de susceptibilidade ao PCV2 nas diferentes raças de suínos envolvidas no estudo. Verificou-se uma maior predisposição para o aparecimento de doenças e lesões características de PCV2 em suínos Landrace (3/19), em comparação com Duroc (0/23) e Large White (0/21) (Opriessnig et al., 2006a).

Mais recentemente, Opriessnig e colaboradores (2009) avaliaram a existência de diferente susceptibilidade ao PCV2 entre suínos Landrace e Pietrain em condições experimentais. Concluiu-se que a gravidade das lesões microscópicas associadas ao PCV2 foi diferente, sendo que os suínos Landrace apresentaram lesões linfoides significativamente ( $P < 0,05$ ) mais severas do que os suínos Pietrain.

### **2.3.3. Vias de transmissão**

#### **2.3.3.1. Horizontal**

O facto de, teoricamente, todos os suínos contactarem com o PCV2, pelo menos uma vez ao longo da sua vida, indica que a transmissão horizontal é muito eficiente. No entanto, deve-se distinguir entre a transmissão de PCV2 e transmissão de PMWS (López-Soria, Grau-Roma & Segalés, 2008).

Relativamente ao PCV2, um estudo realizado por Segalés e colaboradores (2005a) revelou que este estava presente em todas as potenciais vias de secreção e excreção do hospedeiro: nasais, oculares, bronquiais e tonsilares, fezes, saliva e urina. O PCV2 foi encontrado tanto em suínos com PMWS como em suínos não afectados, sendo que maiores cargas virais estavam associadas aos animais que padeciam da enfermidade. O PCV2 foi igualmente detectado no leite das porcas, incluindo colostro (Ha et al., 2009), e em sémen de varrasco, sem que existam alterações na morfologia ou viabilidade dos espermatozóides (McIntosh, Harding, Parker, Ellis & Appleyard, 2006). Num recente estudo longitudinal, no qual os leitões foram monitorizados a partir da primeira semana de vida até o momento em que surgiu a doença, observou-se uma boa correlação entre os níveis de PCV2 detectado no sangue e zaragatoas nasais e rectais, sugerindo a importância de ambos os percursos como vias de excreção do PCV2. O mesmo estudo mostrou uma maior prevalência de PCV2 em zaragatoas nasais que rectais, apoiando a ideia de que a via oro-nasal é, provavelmente, a principal via de transmissão horizontal (Grau-Roma et al., 2008).

Num estudo recente, observou-se o desenvolvimento da doença em suínos saudáveis após mistura com suínos com PMWS. Observou-se ainda que a transmissão da doença foi mais comum entre animais do mesmo parque, mas também foi registada entre suínos de parques vizinhos sem contacto directo – via aérea (Kristensen et al., 2007).

#### **2.3.3.2. Vertical**

Apesar de não se conhecerem bem os mecanismos nem a frequência com que ocorre a transmissão vertical, existem evidências de que esta é possível (entendendo transmissão vertical como a passagem do vírus de uma geração para a outra por infecção do embrião ou feto no útero), como identificado pelo isolamento de PCV2 em leitões abortados, com lesões características no miocárdio (López-Soria et al., 2008).

Por outro lado, demonstrou-se que varrascos infectados com PCV2 podem excretar o vírus através do sémen, e que este pode ser infeccioso. Isto foi observado após a detecção de virémia e de anticorpos contra o PCV2 em leitões seronegativos após inoculação intraperitoneal com sémen positivo para PCV2. No entanto, porcas inseminadas com o mesmo sémen, não manifestaram virémia nem foram detectados anticorpos para PCV2, o mesmo se passando com os seus fetos (López-Soria et al., 2008).

Num artigo de revisão sobre doenças transmitidas através de inseminação artificial em suínos, as doenças reprodutivas encontradas no campo, associadas a PCV2, são descritas como raras. O vírus foi detectado em sémen de varrascos infectados naturalmente e experimentalmente, mesmo após o aparecimento de anticorpos no soro. A excreção através do



sémen foi detectada entre os dias 5 e 47 após a infecção. Como o vírus pode ser excretado intermitentemente pelos varrascos infectados, o sémen pode ser um importante meio de transmissão. O vírus também é capaz de se replicar na zona pelúcida de embriões, levando à morte embrionária (Maes et al., 2008).

### 2.3.4. Factores de risco

O facto do PCV2 poder ser isolado a partir de suínos doentes e saudáveis, provenientes de explorações infectadas ou livres de doença, sem que haja claras diferenças de virulência entre os diferentes vírus isolados nessas explorações, permite julgar que são necessárias causas adicionais ou circunstâncias particulares (factores de risco) que despoletem a replicação viral ao ponto de suplantar o sistema imunitário. (Madec et al., 2008)

#### 2.3.4.1. Deficiências de manejo

O manejo é um dos pilares da suinicultura actual, e apenas através da optimização do mesmo é possível alcançar os melhores resultados. Relativamente ao PMWS a situação é idêntica, sendo que parte da explicação para o facto de umas explorações serem afectadas por PMWS e outras não, está relacionada com o manejo. Alguns dos factores relacionados com instalações, medidas de biossegurança e manejo, que podem aumentar ou diminuir o risco de uma exploração desenvolver PMWS estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Medidas de manejo que influenciam o risco de desenvolvimento de PMWS (Adaptado de López-Soria et al., 2008)

	Aumentam o risco de PMWS	Diminuem o risco de PMWS
Instalações	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Explorações grandes (elevado número de porcas)</li> <li>▪ Parques grandes na recria</li> <li>▪ Fossas comuns em parques adjacentes</li> </ul>	
Medidas de biossegurança	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proximidade com explorações afectadas</li> <li>▪ Visitas de pessoal que contactou com suínos há menos de três dias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Quarentena de porcas e leitões adquiridos</li> <li>▪ Troca de botas e roupa entre diferentes secções</li> </ul>
Manejo	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adopções na maternidade</li> <li>▪ Sémen proveniente da própria exploração</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sistema de auto reposição</li> <li>▪ Porcas desmamadas em parques colectivos</li> </ul>

#### **2.3.4.2. O estatuto imunitário e infeccioso da porca face ao PCV2**

Num estudo realizado recentemente (Calsamiglia et al., 2007) em sete explorações afectadas pelo PCV2, avaliou-se o efeito do estatuto imunitário e infeccioso de 120 porcas na mortalidade das suas ninhadas (420 leitões). Verificou-se que existia uma maior mortalidade em leitões nascidos de porcas virémicas e em porcas com baixos títulos de anticorpos contra PCV2. Os dados recolhidos neste estudo mostram que baixos títulos de anticorpos contra PCV2 em porcas estão positivamente relacionados com a mortalidade dos leitões, o que significa que os anticorpos de origem maternal, presentes nos leitões que tomaram colostro, conferem protecção real contra o desenvolvimento da doença (López-Soria et al., 2008).

Estudos experimentais e observações de campo confirmaram que a transferência de imunidade passiva através de anticorpos maternos contra o PCV2 confere protecção contra o desenvolvimento de PMWS. No entanto, estes anticorpos apenas limitam a circulação e excreção viral até um certo ponto, não sendo eficazes na prevenção da infecção do PCV2. A produção activa de anticorpos ocorre durante o período de recria, cerca das 6-10 semanas, ou mais cedo, caso a infecção seja maciça. Suínos criados em situações ditas normais podem estabelecer imunidade contra PCV2 e não desenvolver PMWS, se forem expostos às proteínas virais com 4-10 semanas de vida e não forem alvo de imunoestimulantes ou co-infecções com outros agentes virais (Radostits et al., 2007).

A presença de elevados títulos de anticorpos contra o parvovírus suíno (PPV) na porca ao parto, indicando uma infecção por PPV durante a gravidez, aumenta o risco dos leitões desenvolverem PMWS (Madec et al., 2008).

#### **2.3.4.3. Co-infecções**

As primeiras experiências bem sucedidas na reprodução experimental de PMWS utilizaram um inóculo contaminado com PPV. Estudos subsequentes demonstraram a existência de sinergismo entre os dois vírus para aumentarem a gravidade dos sinais clínicos e lesões de PMWS (Ellis et al., 2004).

Estudos epidemiológicos descrevem a presença de um maior número de outras infecções ou doenças em explorações afectadas pelo PCV2, como PRRS, PPV, *Mycoplasma hyorhinis*, doença de Aujeszky, doença de Glässer, meningite por *Streptococcus*, salmonelose, colibacilose pós-desmame e pneumonia bacteriana. Permanece a dúvida, se as co-infecções facilitam a expressão do PMWS, ou se é a imunossupressão causada pelo PCV2 que facilita o desenvolvimento dessas infecções. Ainda que esta seja uma questão por resolver, o facto de se conseguir reproduzir experimentalmente PMWS através da co-infecção de PCV2 com PPV,

vírus do PRRS (PRRSV) ou *Mycoplasma hyopneumoniae*, sugere que, pelo menos os agentes referidos, podem contribuir para o desenvolvimento de PMWS em suínos infectados com PCV2 (López-Soria et al., 2008).

Co-infecções experimentais em suínos com PCV2 e outros agentes virais como PPV, PRRSV ou com *Mycoplasma hyopneumoniae* demonstraram um aumento da carga viral de PCV2, das lesões associadas a PCV2 e da incidência das PCVD (Opriessnig et al., 2007).

No entanto, é possível que outros agentes sejam simplesmente infecções concomitantes, sem que haja sinergia entre os mesmos (López-Soria et al., 2008).

Num estudo publicado em 2002, Pallarés e colaboradores identificaram as co-infecções mais comuns nos EUA em 484 casos de suínos com PMWS. Verificou-se que em 52% (251/484) dos casos existia co-infecção com PRRSV, 36% (172/484) com *Mycoplasma hyopneumoniae*, infecções bacterianas em 22% (105/484), vírus da influenza suína (SI) em 5,4% (26/484) e em apenas 2% dos casos se observou exclusivamente PCV2. Os resultados desse estudo estão reportados na figura 5.

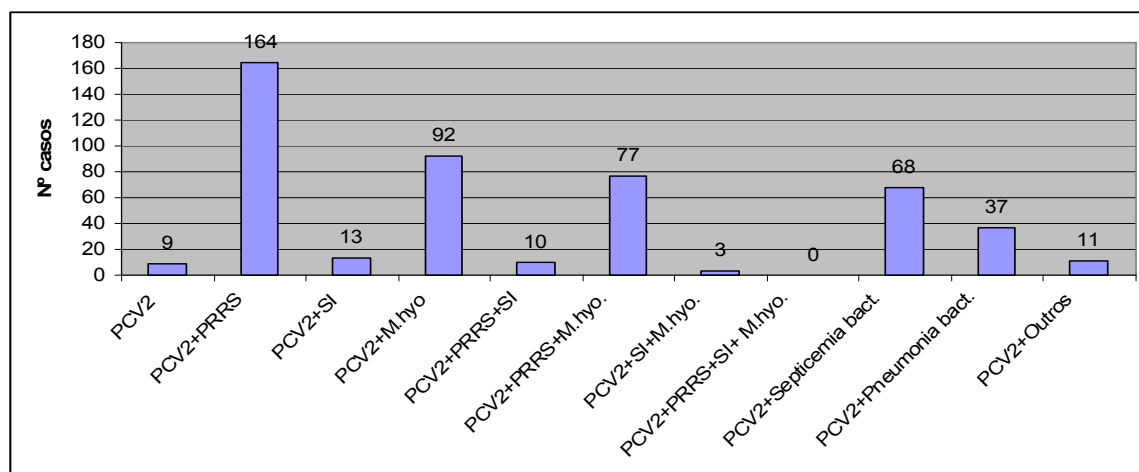


Figura 5. Co-infecções em casos de PMWS (Adaptado de Pallarés et al., 2002)

Num outro estudo semelhante, realizado na Alemanha, avaliou-se a prevalência de outros agentes infecciosos, para além do PCV2, em casos de PMWS, obtendo-se os seguintes resultados: PRRS – 75%; *Haemophilus parasuis* – 13,4%; *Escherichia coli* – 7,7%; *Streptococcus suis* – 7,2%; Coronavírus – 7,2%; SI – 4,4%; *Brachyspira hyodysenteriae* – 4,2% (Radostits et al., 2007).

A exposição de fêmeas grávidas ao PPV, PRRSV, ou vírus encefalomiocardite pode interagir com o PCV2 de fetos infectados. A gravidade das lesões hepáticas em suínos infectados com o PCV2 pode ser aumentada através da co-infecção com agentes como o vírus da hepatite E suína e o vírus da doença de Aujeszky (Ellis et al., 2004).

#### **2.3.4.4. Efeito da imuno-estimulação no desenvolvimento de PMWS**

A forte associação das manifestações clínicas do PCV2 com a estimulação do sistema imune do hospedeiro por outros agentes virais ou bacterianos levou alguns autores a suspeitar se as vacinas e os seus adjuvantes não teriam também elas a capacidade de despoletar/agravar essas mesmas manifestações. Estes pressupostos baseiam-se no facto das vacinas possuírem antigénios e, portanto, actuarem como imunoestimulantes ou como agentes virais ou bacterianos, ainda que em menor escala.

Todos os adjuvantes, quando usados numa fase precoce da infecção, aumentaram a severidade da depleção linfocitária associada ao PCV2. Em fases mais tardias da infecção (35 dias pós-infecção) os adjuvantes água/óleo aumentaram a duração da virémia, os níveis de PCV2 no soro e nos tecidos e a severidade da depleção linfocitária (Radostits et al., 2007).

O primeiro estudo a demonstrar que a estimulação não específica do sistema imune por uma vacina ou um medicamento imuno-modulador pode potenciar a replicação viral e a severidade e duração dos sinais clínicos durante um surto de PMWS foi apresentado por Kyriakis e colaboradores (2002). Para tal, foram seleccionados 84 suínos de uma exploração comercial com um surto de PMWS. Estes suínos foram posteriormente divididos em 3 grupos com 28 indivíduos cada. O primeiro grupo foi vacinado contra o *Mycoplasma hyopneumoniae* (RespiSure®, Pfizer, Nova Iorque, EUA), o segundo foi injectado com um medicamento imuno-estimulante não específico (Baypamun®, Bayer, Leverkusen, Alemanha) e o terceiro era o grupo de controlo. Nesta investigação 50% dos suínos tratados com Baypamun® e 42,9% dos que receberam RespiSure® desenvolveram sinais clínicos característicos de PMWS, sendo que 6 suínos de cada um destes grupos acabaram por morrer. Lesões moderadas a graves, tanto macroscópicas como histológicas características de PMWS foram observadas nos 12 suínos mortos e em mais 3 suínos de cada grupo que foram eutanasiados. Por oposição, apenas 10,7% dos suínos do grupo de controlo desenvolveram sinais clínicos e apenas 1 morreu. Estes resultados indicam que o tratamento dos suínos com Baypamun® ou RespiSure® aumentou a severidade da manifestação clínica durante o surto de PMWS.

Num outro estudo realizado nos EUA por Opriessnig e colaboradores (2003), não foi possível reproduzir a manifestação clínica do PMWS. Na opinião dos autores do estudo, este facto ficou a dever-se à ausência de outros factores de stress no decorrer da experiência. Ao contrário do que se verifica nas condições de campo, estes suínos não estavam afectados por outras patologias, bacterianas ou virais. Para determinar se a vacinação interferia com a expressão clínica do PCV2, os suínos envolvidos no estudo foram divididos em 4 grupos:

Grupo 1 – grupo controlo, suínos negativos a PCV2 e não vacinados para *Mycoplasma hyopneumoniae* + *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App.)

Grupo 2 – 2º grupo controlo, suínos negativos a PCV2 mas vacinados para M. hyo. e App.

Grupo 3 – suínos infectados com PCV2 mas não vacinados para M. hyo. e App

Grupo 4 – suínos infectados com PCV2 e vacinados para M. hyo. e App.

Comparando os suínos do grupo 3 e do grupo 4, verificou-se uma maior duração da virémia (cerca de 2 semanas mais longa), um maior número de cópias do genoma viral no soro, uma mais vasta distribuição tecidual do antígeno viral e um aumento da severidade da depleção linfocitária no grupo vacinado.

Concluiu-se que existe uma clara interferência da vacinação *Mycoplasma hyopneumoniae* na gravidade das lesões provocadas pelo PCV2

## 2.4. PATOGENIA

O PCV2 possui a capacidade de infectar células de origem epitelial, endotelial e mieloide. Este facto ajuda a explicar a vasta distribuição tecidual do vírus e das suas manifestações clínicas (tabela 5). Um estudo recente sobre a infecção e replicação do PCV2 foi realizado usando células endoteliais porcinas, células endoteliais de aorta porcinas, células epiteliais do intestino, fibrócitos e células dendríticas (CD). Em todas as linhas celulares estudadas, à excepção das CD, foi possível reproduzir a replicação do PCV2 (Steiner, Balmelli, Herrmann, Summerfield, & McCullough, 2008).

Tabela 5. Distribuição e frequência da detecção de ácido nucleico de PCV2 por ISH em diferentes tecidos (adaptado de Segalés et al., 2004a)

Tecido	Frequência	%
Tonsila	33/40	82,5
Linfonodos mesentéricos	37/45	82,2
Linfonodos inguinais	33/41	80,5
Placas de Peyer	31/39	79,5
Pulmoes	33/45	73,3
Linfonodos mediastínicos	19/26	73,0
Linfonodos submandibulares	21/29	72,4
Baco	30/43	69,8
Mucosa intestinal	25/39	64,1
Fígado	25/45	55,6
Rim	17/31	54,8
Pancreas	5/11	45,5
Mucosa gástrica	2/5	40,0
Medula óssea	4/10	40,0

A depleção linfóide e linfopénia no sangue periférico estão presentes de forma consistente em suínos que desenvolvem PCVD. No entanto, é ainda desconhecido se a redução de linfócitos nos suínos afectados por PCVD é devida à redução da produção na medula óssea, redução da proliferação nos tecidos linfóides secundários, ou aumento da perda de linfócitos na medula óssea, sangue periférico, ou tecidos linfóides através de necrose ou apoptose induzida pelo PCV2 (Opriessnig et al., 2007).

A carga viral de PCV2 nos tecidos está directamente relacionada com a gravidade das lesões e manifestações clínicas subsequentes (Krakowka, Ellis, McNeilly, Waldner & Allan, 2005).

A activação das células do sistema imune numa fase precoce da infecção é a chave para a expressão da virulência do PCV2. Suínos infectados com PCV2 e submetidos a imunestimulação têm maior probabilidade de desenvolver PCVD (Krakowka et al., 2001).

#### **2.4.1. Dinâmica da infecção**

Estudos que comparam explorações afectadas por PMWS com explorações não afectadas por PMWS mostram que as afectadas apresentam uma maior percentagem de suínos com anticorpos contra PCV2, cerca dos três meses de idade. Estes achados sugerem que a infecção pelo vírus ocorre numa fase mais precoce nas explorações afectadas por PMWS que nas não afectadas. Dos referidos estudos conclui-se ainda que, aparentemente, quanto mais cedo ocorrer a infecção por PCV2, maior o risco de desenvolver PMWS (Rose et al., 2003; Lopez-Soria et al., 2005).

A dinâmica da infecção e a seroconversão são muito semelhantes tanto em explorações afectadas por PCV2 como em explorações não afectadas. Os anticorpos maternos estão presentes em praticamente todos os leitões desde a toma do colostro e vão diminuindo progressivamente durante a lactação e recria. A virémia por PCV2 apenas surge na fase final da recria e no início da engorda, coincidindo com o momento em que os anticorpos maternos alcançam os seus níveis mínimos. Na sequência destes eventos os suínos produzem anticorpos e seroconvertem face ao PCV2. À medida que os níveis de anticorpos contra PCV2 aumentam, observa-se uma progressiva diminuição da virémia. Estes anticorpos estarão presentes até, pelo menos, às 28 semanas de vida (López-Soria et al., 2008).

Ainda que a dinâmica de infecção descrita seja observada na maioria das explorações, há que ter em conta que o seu comportamento varia consoante as características epidemiológicas de cada exploração e, mesmo dentro da exploração, existem variações individuais. Uma pequena percentagem de suínos pode mesmo ser infectada com poucos dias de vida.

#### **2.4.2. Carga viral**

Vários estudos indicam que os animais afectados com PMWS têm maiores quantidades de PCV2 em diversos tecidos, em comparação com animais que não sofrem da doença. A detecção do vírus no soro por PCR quantitativa pode produzir resultados mais variáveis. Portanto, usando esta tecnologia, a detecção de grandes quantidades de PCV2 no soro indica um aumento da probabilidade do animal estar a sofrer da doença, mas não o suficiente para

estabelecer o diagnóstico de forma inequívoca de PMWS ao nível individual (López-Soria et al., 2008).

### 2.4.3. Imunologia

Muitos dos sinais clínicos associados a infecção por PCV2 sugerem a presença de disfunção imunológica. Em particular, no caso dos animais afectados por PMWS, a hipertrofia dos linfonodos (principalmente os inguinais), as extensas lesões linfoides (depleção linfocitária e inflamação granulomatosa através da infiltração de macrófagos dos tecidos linfoides) e os padrões de expressão de citocinas alterados quer no sangue quer nos órgãos linfoides (Opriessnig, Yu, Thacker & Halbur, 2004; Kekarainen, Montoya, Mateu & Segalés, 2008).

Estas lesões estão altamente relacionadas com a diminuição de níveis circulantes de linfócitos B e T (leucopénia), com a diminuição destes tipos celulares nos órgãos linfoides e com o aumento de monócitos e macrófagos no sangue e nos órgãos linfoides, respectivamente. As referidas alterações das populações celulares do sistema imune tanto no sangue como nos órgãos sugerem que nos animais afectados com PMWS existe uma incapacidade para montar uma adequada resposta imunitária (Segalés et al., 2004b).

Do ponto de vista clínico as imunodeficiências estão normalmente associadas a enfermidades por organismos de baixa patogenicidade ou por vacinas vivas atenuadas, enfermidades recorrentes de difícil controlo, falência de resposta adequada a vacinação, doença neonatal sem causa definida e mortalidade afectando mais do que um animal por ninhada e uma variedade de síndromes ocorrendo em simultâneo na exploração. Muitos destes casos foram descritos associados a PMWS. A deficiente resposta a antibioterapia, a existência do efeito de ninhada, a ocorrência concorrente de outras síndromes e infecções secundárias bem conhecidas sugerem a presença de imunossupressão em animais afectados por PMWS (Segalés et al., 2004b).

Por estas razões, a imunologia relacionada com as infecções por PCV2 tem sido alvo de muitos estudos. No entanto, apesar dos esforços dos investigadores, ela permanece ainda uma grande incógnita, um “puzzle” para o qual apenas se conhecem algumas das peças.

Análises realizadas *in vivo* revelaram que o PCV2 está geralmente associado com células processadoras de antígeno – monócitos, macrófagos e CD. Estas observações foram suportadas por análises *in vitro* que confirmaram a preferência do PCV2 por CD e células produtoras de interferão (natural interferon-producing cells – NIPCs). Além desta sólida associação, o PCV2 pode também ser encontrado em células endoteliais, epiteliais, e linfócitos. De referir também que, se ocorrer infecção intra-uterina, o vírus pode acumular-se nos cardiomiócitos.



Todos os animais infectados possuem antígenos virais nos macrófagos e nas CD, sem que exista aparente disfunção destas células, o que resulta numa associação persistente entre os vírus e estas células. Apesar desta associação, o vírus não se replica no interior destas células. A replicação viral foi confirmada *in vitro*, mas no interior das células endoteliais e do epitélio intestinal, especialmente quando estas células são activadas, o que ocorre quando existem respostas inflamatórias locais. A referida activação relaciona-se muitas vezes com a presença de estímulos secundários, como são as co-infecções, imunoestimulação ou imunossupressão, sendo estas essenciais para que ocorra o imunocomprometimento causado pelo PCV2 (McCullough et al., 2007).

O PCV2 não induz morte celular nas CD, nem em linfócitos presentes em culturas celulares com CD infectados com PCV2. Nas referidas culturas não foi observada transmissão de vírus entre as CD infectadas e os linfócitos, nem mesmo após activação linfocitária. Não obstante a presença de elevados níveis de PCV2 (de tal forma que se suspeita de uma incapacidade das CD em degradar o vírus) nas CD infectadas, estas mantêm a sua capacidade de processar e apresentar antígenos aos linfócitos, sem aparente alteração. É a capacidade das CD, e de outras células monocíticas e apresentadoras de antígeno, de reconhecer sinais de “perigo” que está prejudicada pelo PCV2. O alvo da imunomodulação pelo PCV2 é a rápida detecção de uma potencial ameaça patogénica pelos mecanismos de defesa não específicos do organismo (McCullough et al., 2007).

Dois tipos de CD são uma parte importante dos mecanismos de defesa não específicos: as CD mieloides e as CD plasmocíticas. As CD mieloides imaturas caracterizam-se pela sua grande capacidade de captar e processar antígenos, enquanto que as CD mieloides maduras são responsáveis pela activação dos linfócitos T. Para que haja maturação das CD mieloides, é necessária a ocorrência de inflamação e a produção de interferão tipo I e do TNF por parte das CD plasmocíticas (Junqueira & Carneiro, 1999; Male, Brostoff, Roth & Roitt, 2007).

Os sinais aos quais as CD mieloides imaturas são particularmente sensíveis e que levam à maturação das mesmas são designados sinais de “perigo” (PAMP - pathogen-associated molecular pattern). É através do devido reconhecimento destes sinais e do correcto processamento dos antígenos patogénicos que se desenvolve uma eficaz resposta imune, tanto inata como específica. Na ausência do eficaz reconhecimento destes sinais de “perigo” a eficácia das CD é reduzida ou mesmo anulada (McCullough, Ruggli & Summerfield, 2009).

O PCV2 interfere com a produção dos factores de maturação por parte das CD plasmocíticas, impedindo, desta forma, a activação dos linfócitos T por parte das CD mieloides maduras, que tem como consequência a ausência de respostas imunitárias específicas contra outros agentes patogénicos (McCullough et al., 2007).

Num estudo recentemente publicado (Kekarainen et al., 2008), foi observada a influência do PCV2 na produção de citocinas em resposta a outros estímulos patogénicos. Em dois grupos de animais imunizados contra vírus de Aujeszky, apenas um estava infectado com PCV2. Quando ambos os grupos foram estimulados com o vírus de Aujeszky, verificaram-se diferenças na resposta imunitária, nomeadamente a produção de IFN- $\gamma$  que foi significativamente menor nos animais infectados com PCV2 (redução de 77%;  $P<0,01$ ). Neste estudo, avaliou-se também a capacidade das células mononucleares do sangue de produzir IL-10, em resposta ao PCV2, e verificou-se que, em todos os animais envolvidos no estudo, o PCV2 induzia a produção de quantidades substanciais de IL-10 pelas referidas células. Os resultados deste estudo indicam ainda que a IL-10 induzida pelo PCV2 interfere com as respostas antigénicas de memória através da inibição de IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  e IL-12. O PCV2 também inibiu a produção de IL-2, mas através de um mecanismo independente da IL-10. Estas observações indicam que a infecção por PCV2, em parte através da indução de IL-10, leva à ausência de respostas antígeno-específicas, tornando desta forma os animais susceptíveis a outros agentes patogénicos.

Estes resultados foram também registados por Fort e colaboradores (2009), que avaliaram a resposta de citocinas *in vitro*. Após a estimulação com PCV2 das células mononucleares do sangue, não se verificou indução de IL-2, IL-4 ou IFN- $\gamma$ . Por sua vez, a produção de IL-10 foi significativamente maior, quando comparada com outra cultura celular não estimulada pelo PCV2.

## **2.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

### **2.5.1. PMWS**

PMWS afecta, principalmente, suínos de 7 a 15 semanas de idade, correspondendo a suínos nas fases de final da recria e início de engorda do sistema de produção. No entanto, a doença tem sido descrita em animais desde os 3 dias aos 6 meses de idade (Madec et al., 2008).

A gravidade e tipo de manifestação da doença varia consideravelmente entre suínos dentro de um grupo. Assim, enquanto alguns animais num parque podem ser gravemente afectados, os restantes suínos podem não apresentar quaisquer sinais óbvios de doença. A morbilidade e mortalidade são variáveis, dependendo da exploração e do lote de animais, sendo registados valores de 4-30% e 70-80%, respectivamente.

#### **2.5.1.1. Sinais clínicos**

Ainda que a presença de alterações respiratórias e o emagrecimento numa proporção de animais na fase final da recria e no início da engorda sejam indicativos de PMWS, a maioria dos sinais clínicos desta doença são inespecíficos. Mesmo os sinais anteriormente descritos podem surgir como manifestações clínicas de outras doenças ou patologias. Por este motivo a suspeita de PMWS com base em lesões macroscópicas só deve ser estabelecida quando se identifica todo o quadro lesional característico da condição (Segalés et al., 2004a).

O acrónimo PMWS define o principal sinal clínico que é emagrecimento e/ou atraso do crescimento. Além disso, os suínos afectados também podem apresentar outros sinais, como febre (até 41 ° C), palidez cutânea, dispneia, diarreia e ulceração gástrica. Sinais como a icterícia, morte súbita, meningite e febre, também foram descritos, mas com menor frequência. Alguns desses sinais clínicos podem ser causados, em parte, ou agravados pelas concomitantes infecções secundárias anteriormente mencionadas (Madec et al., 2008).

#### **2.5.1.2. Lesões macroscópicas**

Os principais quadros lesionais traduzem-se pela presença de pulmões não colapsados com uma coloração bronze mosqueada e acentuado edema intersticial, a presença de linfonodos hipertrofiados (principalmente os inguinais, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos) e atrofia do timo. No entanto, estas lesões não estão sempre presentes e isoladamente, não devem conduzir à suspeita de PMWS numa exploração. Por vezes, é possível encontrar linfonodos de tamanho normal, ou até atrofiados, com severas lesões microscópicas características de PMWS. Numa pequena proporção de casos, são observáveis áreas de necrose multifocais nos linfonodos visíveis macroscopicamente.

Outras alterações muitas vezes encontradas em animais com PMWS são a diminuição do tamanho do fígado (casos em que os animais apresentam icterícia) com descoloração amarelo-alaranjada do mesmo, e a presença de múltiplos focos de descoloração de diâmetro variável nos rins.

Suínos afectados por PMWS podem apresentar consolidação pulmonar cranio-ventral (devido a broncopneumonia) e ulceração gástrica da zona do cárdia, que estão normalmente associados com infecções bacterianas e origem multifactorial, respectivamente, e não como consequência directa da infecção por PCV2. A ulceração gástrica pode provocar hemorragias internas que agravam a palidez da pele destes animais (observação frequentemente associada a esta doença) e que são muitas vezes responsáveis pela sua morte. Por outro lado, também existem registos da presença de anemia não associada a ulceração gástrica em animais severamente afectados por PMWS (Segalés et al., 2004a).

A frequência de lesões macroscópicas em suínos com PMWS é apresentada resumidamente na tabela 6.

Tabela 6. Frequência de lesões macroscópicas observadas em 396 suínos com PMWS (Adaptado de Segalés et al., 2004a).

Alteração macroscópica	Frequência	%
Emagrecimento (com espinha dorsal marcada)	318	80,3
Pulmões não colapsados com coloração mosqueada	255	64,4
Consolidação pulmonar (broncopneumonia)	235	59,3
Aumento de pelo menos um linfonodo	209	52,8
Ulceração gástrica	113	28,5
Rins com focos de descoloração	73	18,4
Atrofia hepática	13	3,3
Icterícia	12	3,0
Necrose dos linfonodos	9	2,3

### 2.5.1.3. Lesões microscópicas

As lesões microscópicas originadas pelo PMWS nos tecidos linfoides são quase únicas no suíno. Depleção linfocitária de diferentes níveis e perda da arquitectura folicular dos linfonodos são achados comuns a quase todos os animais afectados. Estas alterações estão geralmente associadas a infiltração histiocítica e/ou de células gigantes multinucleadas com distribuição multifocal a difusa. Outro achado importante em animais afectados por PMWS é

a presença de inclusões citoplasmáticas basófilas de PCV2 no interior das células histiocíticas.

Relativamente aos pulmões, a lesão mais comum é uma pneumonia sub-aguda intersticial com infiltrados alveolares e peribrônquicos mononucleares (linfócitos e macrófagos). Fibrose peribrônquica ocorre em casos avançados. O edema intersticial observado microscopicamente é acompanhado de distensão dos septos pulmonares. Em alguns casos é possível observar histiócitos ou células gigantes multinucleadas nas paredes interalveolares e/ou no interior dos alvéolos. Por vezes, os animais afectados apresentam depleção linfocitária e infiltração histiocítica do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT). Contrariamente às lesões linfóides, que são muito características e sugestivas de PMWS, as lesões pulmonares podem ser causadas por múltiplos agentes infecciosos, quer bacterianos quer virais, exigindo uma vasta lista de diagnósticos diferenciais quando só é possível analisar amostras pulmonares (Segalés et al., 2004a).

As lesões hepáticas consistem igualmente em infiltração linfocitohistiocítica, mas são geralmente ligeiras e com distribuição focal ou multifocal. Um número variável de hepatócitos com sinais claros de apoptose pode ser observado em alguns animais. Num reduzido número de casos, uma alteração citopática difusa e inflamação do parênquima hepático pode ocorrer, com uma acentuada perda de hepatócitos, aumento da quantidade de tecido fibroso no interstício, e infiltrados inflamatórios no tecido hepático. Estes últimos estão associados a icterícia generalizada e a lesões macroscópicas descritas no fígado (Rosell, Segalés & Domingo, 2000).

As lesões hepáticas causadas pelo PCV2 foram descritas por Rosell e colaboradores (2000) em 4 estádios:

- Estadio I – ligeira presença de infiltrado mononuclear inflamatório nas áreas perilobulares.
- Estadio II – infiltração mononuclear inflamatória das áreas perilobulares e foco inflamatório na área periportal.
- Estadio III – presença de marcada infiltração mononuclear inflamatória das zonas perilobulares, desorganização dos lóbulos hepáticos com presença de células inflamatórias no interior dos mesmos.
- Estadio IV – marcada fibrose perilobular, desorganização dos lóbulos hepáticos com infiltrado mononuclear difuso e perda massiva de hepatócitos.

Lesões microscópicas observadas nos rins consistem em nefrite intersticial não-purulenta. Esta lesão, na idade em que o PMWS costuma ocorrer, é quase exclusiva desta doença.

De uma forma geral, é possível observar-se, em animais severamente afectados por PMWS, presença de ligeiros a moderados infiltrados inflamatórios linfo-histiocíticos em praticamente todos os tecidos (Segalés et al., 2004a).

A frequência de lesões microscópicas em suínos com PMWS é apresentada resumidamente na tabela 7.

Tabela 7. Frequência de lesões microscópicas observadas em 396 suínos com PMWS (Adaptado de Segalés et al., 2004a).

Alteração microscópica	Frequência	%
<b>Tecidos linfoides</b>		
Depleção linfocitária	353	89,1
Infiltração histiocítica inflamatória	305	77,0
Corpos de inclusão intracitoplasmáticos	137	34,6
Células gigantes multinucleadas	113	28,5
<b>Pulmões</b>		
Pneumonia intersticial	304	76,8
Broncopneumonia catarral purulenta	218	55,1
<b>Fígado</b>		
Estadio I	131	33,1
Estadio II	34	8,6
Estadio III	8	2,0
Estadio IV	5	1,3
Total	178	45,0
<b>Rim</b>		
Nefrite intersticial	149	37,6
<b>Colon</b>		
Colite linfoplasmocítica	68	15,0

### 2.5.2. PDNS

O PDNS pode afectar suínos da recria, engorda e, esporadicamente, animais adultos. A prevalência da síndrome nas explorações afectadas é relativamente baixa, inferior a 1% (normalmente entre 0,05 e 0,5%). A mortalidade em suínos com 3 ou mais meses de idade ronda os 100%, enquanto nos suínos com idades compreendidas entre 1,5 e 3 meses é de 50%. Suínos com doença aguda grave morrem em poucos dias após o aparecimento dos sinais clínicos (Segalés, Allan & Domingo, 2005b).

### **2.5.2.1. Sinais clínicos**

Os suínos afectados por PDNS apresentam anorexia, depressão, prostração, relutância em se movimentar e temperaturas normais ou febre ligeira.

No entanto, o sinal mais evidente, particularmente na fase aguda da doença, é a presença de lesões de pele que se caracterizam por máculas e pápulas irregulares, vermelho a púrpura, que ocasionalmente coalescem para formar grandes manchas e placas irregulares. Com o tempo, as lesões ficam cobertas por crostas escuras e desaparecem gradualmente, por vezes deixando cicatrizes. A distribuição típica inclui a área perineal dos quartos traseiros, membros, partes ventrais do abdómen e tórax e as orelhas. Nos casos mais graves, o flanco e a parede torácica lateral também podem estar envolvidos. Em raras ocasiões, lesões multifocais são observadas aleatoriamente ao longo de todo o corpo.

A causa de morte em suínos afectados por PDNS é uma insuficiência renal aguda, geralmente com aumento muito acentuado dos níveis séricos de creatinina e ureia (Drolet, Thibault, D'Allaire, Thomson & Done, 1999).

### **2.5.2.2. Lesões macroscópicas**

Além das lesões cutâneas, os suínos afectados apresentam os rins hipertrofiados, pálidos, edemaciados e com petéquias corticais em todo o órgão. Numa pequena percentagem de animais, considerados como casos de PDNS, não são visíveis lesões cutâneas, enquanto que outros apresentam alterações renais muito ligeiras ou mesmo ausentes. Estes casos são considerados atípicos do síndrome devido a presença regular de vasculite sistémica necrosante (Segalés et al., 2004a).

### **2.5.2.3. Lesões microscópicas**

Na pele surgem máculas e pápulas vermelho a escuro que correspondem microscopicamente a tecido necrótico associado a vasculite necrosante dos capilares e arteríolas da derme e da hipoderme e extensas hemorragias. A vasculite necrosante é uma característica sistémica, uma vez que essas lesões podem estar presentes em qualquer tecido, apesar de serem mais proeminentes na pele, pelve renal, mesentério e baço.

No rim, o córtex renal apresenta múltiplas pequenas lesões avermelhadas, semelhantes a hemorragias petequiais, que correspondem a glomérulos inflamados e aumentados, com fibrina, células inflamatórias necróticas e eritrócitos no interior do espaço de Bowman (glomerulite fibrino-necrosante). Histologicamente, uma nefrite intersticial moderada a grave não-purulenta com dilatação dos túbulos renais também é observada. Suínos que padecem de

uma evolução clínica arrastada podem apresentar glomerulonefrite crónica, provavelmente resultante da progressão da lesão glomerular inicial. Normalmente, tanto as lesões da pele como as renais estão presentes em casos de PDNS, mas, esporadicamente, podem ocorrer isoladamente.

Os gânglios linfáticos renais podem estar hipertrofiados e com uma coloração vermelha devido ao sangue drenado das zonas afectadas com hemorragias (principalmente da pele). Lesões semelhantes aos PMWS, microscopicamente, como depleção linfocitária e um certo grau de infiltração histiocítica e/ou de células gigantes multinucleadas, são frequentemente observadas nos tecidos linfóides de suínos com PDNS.

Enfartes esplénicos podem estar também presentes, como resultado de uma vasculite necrosante das artérias e arteríolas esplénicas (Segalés et al., 2004a).

### **2.5.3. Pneumonia necrosante proliferativa (PNP)**

Esta é uma forma grave de pneumonia intersticial caracterizada por hipertrofia e proliferação de pneumócitos tipo 2 e da presença de células necróticas no interior do lúmen alveolar. A PNP tem sido associada a muitos agentes virais, particularmente o PRRSV.

Um estudo realizado em Espanha por Grau-Roma e Segalés (2007) investigou a etiologia desta afecção. Para esta investigação foi associado o exame histopatológico à ISH para detectar a presença do PCV2, e à IHC para detecção de PRRSV, SI e doença de Aujeszky. O PCV2 foi o agente viral mais prevalente nos casos de PNP (85,1%), seguido do PRRSV (44,6%). Em 39,1% dos casos, o PCV2 foi o único agente detectado, enquanto que apenas 4,1% tinham o PRRSV como único agente. A doença de Aujeszky e a SI foram detectadas muito esporadicamente nos casos PNP, e sempre em casos co-infectados com PCV2. Portanto, os dados obtidos neste estudo indicam que PCV2 é o agente etiológico mais importante de PNP em Espanha.

### **2.5.4. Enterite associada a PCV2**

Os casos de enterite associada a PCV2 são cada vez mais comuns. A maior parte dos suínos atingidos tem entre 8 a 16 semanas de idade. As ocorrências de enterite associada a PCV2 são semelhantes clínica e lesionalmente à ileíte subaguda ou crónica associada a *Lawsonia intracellularis*.

A mucosa intestinal apresenta-se muito espessada e os linfonodos mesentéricos hipertrofiados. O exame microscópico confirma a presença de enterite granulomatosa, que é geralmente associada a abundantes cargas de antígeno de PCV2.



A enterite associada a PCV2 foi diagnosticada por histopatologia, isolamento de PCV2, e ISH de PCV2, em leitões desmamados, numa exploração aparentemente livre de PMWS e de PDNS. Os suínos não apresentavam depleção linfóide ou substituição histiocítica nos folículos dos tecidos linfóides (Kim, Ha, Jung, Choi & Chae, 2004).

### **2.5.5. Falhas reprodutivas**

A infecção por PCV2 foi associada à falência reprodutiva caracterizada por abortos tardios nados mortos, na ausência ou presença de outros agentes patogénicos. Quase todas estas descrições de distúrbios reprodutivos são reportadas por autores norte-americanos e muito poucos casos foram relatados na Europa. Nados mortos e leitões neonatais não viáveis apresentam congestão hepática crónica e hipertrofia cardíaca com zonas de descoloração multifocal no miocárdio. A principal lesão microscópica está presente no coração, onde se observa uma miocardite fibrosante e/ou necrosante (característico de falências reprodutivas associadas ao PCV2) (Segalés et al., 2005b).

Embora existam provas convincentes de que o PCV2 é um agente patogénico que afecta o aparelho reprodutivo, os dados de campo sugerem que a maioria das explorações são imunes e as falhas reprodutivas associadas a PCV2 são relativamente raras (Opriessnig et al., 2007).

### **2.5.6. Tremores congénitos**

Nos Estados Unidos, o PCV1 e o PCV2 foram associados à presença de tremores congénitos em leitões. Num estudo realizado por Kennedy e colaboradores (2003), o sistema nervoso central e outros tecidos não nervosos de 40 leitões com tremores musculares, provenientes de Espanha, Reino Unido, Irlanda e Suécia foi investigada a presença de PCV1 e PCV2, utilizando ISH. Foi também usado o teste PCR para PCV2 nos soros dos casos espanhóis. Não se observaram evidências da presença de qualquer antigénio ou ácido nucleico de qualquer PCV nos leitões com tremores congénitos investigados.

Tendo em conta o elevado valor preditivo negativo do teste de PCR para PCV2, a probabilidade do PCV2 ser o agente etiológico destes tremores congénitos é muito reduzida.

## **2.6. DIAGNÓSTICO**

### **2.6.1. Diagnóstico de exploração**

A ubiquidade do PCV2 na população de suínos representa uma dificuldade na avaliação do estado sanitário de uma exploração. Por esta razão, um PCR ou serologia positivos apenas indicam a presença de infecção, não sendo em nenhum caso indicativo de doença.

O diagnóstico de PMWS ao nível da exploração torna-se algo controverso uma vez que em explorações com excelentes índices produtivos, é possível encontrar casos esporádicos de suínos com PMWS (López-Soria et al., 2008). Por esta razão, cientistas do Consórcio Europeu para a Investigação de PCVD ([www.pcvd.org](http://www.pcvd.org)) propuseram uma definição de surto a nível da exploração. Tendo em conta essa definição, considera-se que uma exploração está afectada por PMWS quando satisfaz as seguintes condições:

- Surgimento de um significativo aumento na taxa de mortalidade e atraso no crescimento na recria (pós-desmame), comparado com os valores normais para a exploração. Se existirem registos dos índices de mortalidade verificados ao longo do tempo na exploração, o aumento de mortalidade considera-se significativo quando for igual ou superior ao nível histórico mais 1,66 vezes o desvio-padrão. Se não existirem registos da mortalidade da exploração, considera-se um aumento significativo quando a mortalidade exceda em 50% a média nacional ou regional.
- Os três critérios para diagnóstico individual devem ser cumpridos em pelo menos um de cinco suínos necropsiados.

### **2.6.2. Diagnóstico individual**

Os sinais clínicos e as lesões inespecíficas associadas à ubiquidade do PCV2 no efectivo suíno tornam o diagnóstico de PMWS um dos mais complexos da produção de suínos. Por esta mesma razão, Sorden (2000) propôs uma definição de diagnóstico de PMWS individual assente em três pressupostos:

- Presença de sinais clínicos como atrasos no crescimento, emaciação, frequente presença de dispneia e aumento dos linfonodos inguinais, e ocasionalmente icterícia.
- Lesões histológicas características: depleção linfocitária nos órgãos e no sangue, inflamação granulomatosa ou linfocitocítica em qualquer órgão (com maior frequência pulmões e tecidos linfoides, podendo ocorrer no fígado, rins, pâncreas e intestino) e corpos de inclusão de PCV2.
- Detecção de PCV2 nas referidas lesões.

Estes pressupostos para a definição do diagnóstico de PMWS implicam que a presença de sinais clínicos isoladamente não representa prova de diagnóstico, apenas um indício de presença da afecção, pois existem inúmeras etiologias para a diminuição da performance dos animais na recria e início de engorda. Apesar de a maioria dos animais que sofrem de PMWS apresentarem pneumonia intersticial, caracterizada pelo padrão mosqueado vermelho e bronze com pulmão não colapsado e aumento dos linfonodos moderado a grave, estas lesões são inespecíficas e podem ser encontradas noutras doenças como PRRS e salmonelose septicémica. Por fim, a presença de PCV2 não implica que exista PMWS, ou seja, para que o diagnóstico seja conclusivo, é necessária a detecção do vírus nas lesões típicas num animal com claro atraso de crescimento/emagrecimento (Sorden, 2000).

No entanto, em explorações afectadas é possível encontrar suínos saudáveis, mas com lesões microscópicas típicas de PMWS de grau moderado nos tecidos linfoides, associadas a cargas moderadas de ácido nucleico de PCV2. Por outro lado, uma percentagem de animais que sofrem de PMWS consegue recuperar e, apesar do aspecto emaciado dos animais nesta fase crónica, os exames histopatológicos revelam pequenas ou nenhuma lesões compatíveis com PMWS assim como quantidades mínimas de PCV2 nos tecidos linfoides. Tendo estes factos em conta, as melhores amostras para procura de lesões microscópicas de PMWS e isolamento de PCV2 nessas mesmas lesões, são os tecidos linfoides (tonsilas, timo, baço, ileo – placas de Peyer, linfonodos) de suínos na primeira semana de doença clínica (Segalés et al., 2004a).

Para que o diagnóstico de PMWS seja realizado é necessária a submissão de tecidos fixados em formol para um laboratório de referência. Os tecidos mais indicados são os linfoides, mas é também aconselhável o envio de amostras de pulmão, fígado, rim e pâncreas. Estômago, duodeno, jejuno e cólon podem, por vezes, ser utilizados.

Para a detecção do PCV2 nas lesões características de PMWS existem diversas técnicas. No entanto duas delas são mais frequentemente utilizadas: IHC, para detecção de antigénio, e ISH, para detecção de ácido nucleico.

Existe uma correlação positiva entre a gravidade das lesões microscópicas nos tecidos linfoides e a carga viral de PCV2 detectada nessas mesmas lesões. O problema surge quando é necessário interpretar casos em que as lesões típicas de PMWS são ligeiras e as cargas virais são reduzidas. Para tentar evitar este problema, devem enviar-se, sempre que possível, amostras de diversos animais, de modo a não se basear o diagnóstico em apenas um suíno e aumentar as possibilidades de se identificarem animais com resultados conclusivos. A interpretação dos resultados laboratoriais deve ser feita em consonância com a evolução clínica da doença. Quando surgem lesões moderadas de PMWS com cargas virais mínimas, podem ser feitas três interpretações diferentes: em primeiro lugar, os animais podem sofrer de

uma forma subclínica da doença e, se estes manifestarem sinais clínicos semelhantes aos do PMWS, devem ser feitas análises para diagnóstico de outros microrganismos que possam ser causa dos mesmos; outra das possibilidades é que os suínos estejam numa fase inicial do desenvolvimento de PMWS. Neste caso, existe a hipótese das amostras terem sido colhidas muito cedo, e devem repetir-se fazendo recolhas em suínos uma semana mais velhos que os anteriores; por último, os suínos podem estar numa fase convalescente da doença, significando que as amostras foram colhidas numa fase tardia da evolução da doença, onde o sinal clínico dominante é a emaciação crónica (Segalés, 2002).

Relativamente à definição de caso de PDNS, esta inclui dois critérios principais:

- Presença de lesões cutâneas do tipo hemorrágica e necrosante, localizadas principalmente na região perineal e dos membros posteriores, e/ou rins hipertrofiados e pálidos, com presença de petéquias corticais generalizadas.
- Presença de vasculite necrosante sistémica e glomerulonefrite necrosante fibrinosa.

Do ponto de vista diagnóstico, a detecção de PCV2 não é actualmente incluída no critério de diagnóstico para PDNS (Segalés et al., 2005b).

A definição de problemas reprodutivos associados a infecção por PCV2 ainda não foi formalmente estabelecida, mas, tendo em conta as características clínico-patológicas dos casos descritos, três critérios principais devem ser incluídos:

- Abortos tardios e nados mortos, por vezes com evidente hipertrofia do coração fetal.
- Presença de lesões cardíacas caracterizadas por fibrose extensa e/ou miocardite necrosante.
- Presença de grandes quantidades de PCV2 nas lesões do miocárdio e noutros tecidos fetais (Segalés et al., 2005b).

Foi proposto, por Kim e colaboradores (2004), um diagnóstico para enterite associada a PCV2:

- Diarreia presente;
- Lesões características presentes nas placas de Peyer, mas não noutros nódulos linfáticos;
- Antigénio de PCV2 ou ácido nucleico presente nas lesões.

### **2.6.3. Diagnóstico diferencial**

O vasto leque de possíveis manifestações clínicas do PCV2 exige um extenso e variável diagnóstico diferencial, dependendo dos sinais clínicos dominantes.

Na lista de diagnósticos diferenciais para PMWS, a primeira e mais importante entidade a ser incluída na lista é a forma respiratória de PRRS. No entanto, a ampla distribuição desta síndrome na maioria dos países faz com que a diferenciação entre PRRS e PMWS seja muito

difícil. Além disso, todas as doenças e condições que causem emagrecimento devem ser incluídas no diagnóstico diferencial. De uma forma geral, além de PRRS, doenças como a doença de Glässer, peste suína clássica, doença de Aujeszky, disenteria suína, ileíte, colibacilose pós-desmame ou eperitrozoonose, entre outras, devem ser incluídas na lista de diagnósticos diferenciais, dependendo do sinal clínico dominante e do país de origem.

No caso do diagnóstico diferencial para PDNS, devem ser incluídas condições que causam descoloração vermelha a preta da pele, bem como as que causam hemorragias petequiais nos rins. Especial atenção deve ser dada às semelhanças entre as lesões de PDNS e a peste suína clássica ou africana, mas também devem ser incluídas na lista de diagnóstico diferencial a salmonelose e infecções por *Actinobacillus suis* e *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Mal rubro).

As falhas reprodutivas associadas ao PCV2 podem ser clinicamente indistinguíveis de outras doenças que causam abortos tardios e nados mortos em suínos, como PRRS, doença de Aujeszky, PPV, SI, infecções por enterovírus, peste suína clássica, erisipela e leptospirose (Segalés et al., 2005b).

As lesões pulmonares causadas por PCV2 são quase indistinguíveis das induzidas pelo PRRSV ou mesmo infecções sistémicas bacterianas como a salmonelose. Mesmo as lesões microscópicas de suínos infectados com PCV2 no pulmão (pneumonia intersticial) não são exclusivas. No entanto, a presença de substituição epitelial da mucosa ou submucosa por infiltrados celulares linfo-histiocíticos em todos lobos pulmonares são consideradas lesões bastante características da infecção por PCV2 (Segalés et al., 2004a).

## **2.6.4. Técnicas de diagnóstico**

### **2.6.4.1. Métodos de detecção de ácido nucleico e antígeno viral de PCV2**

Como referido anteriormente, ISH e IHC são as técnicas mais utilizadas para detectar PCV2. Estas técnicas pesquisam, respectivamente, ácido nucleico e antígeno que, em suínos afectados, são geralmente encontrados no citoplasma dos histiócitos, células gigantes multinucleadas e células da linha monocítica como macrófagos alveolares, células de Kupffer e CD de tecidos linfóides. Também é possível detectar ácido nucleico viral ou antígeno no citoplasma do epitélio renal e respiratório, endotélio vascular, pancreático e células musculares lisas, hepatócitos e enterócitos. Em fetos, as principais células para encontrar PCV2 são os cardiomiócitos.

Foi observada uma forte correlação entre a quantidade de ácido nucleico ou antígeno de PCV2 e a gravidade das lesões microscópicas linfóides em suínos com PMWS. Uma vez que o montante de PCV2 presente nas lesões características é a grande diferença entre suínos afectados por PMWS e suínos infectados subclínicamente, as técnicas que permitem a

quantificação do vírus em tecidos e/ou soro, tais como PCR quantitativo e ELISA poderiam potencialmente ser usados para diagnosticar PMWS, na impossibilidade de recorrer à histopatologia (Segalés et al., 2005b).

#### **2.6.4.1.1. PCR**

A maioria dos suínos é infectada com PCV2 em algum momento das suas vidas. Portanto, o uso de PCR é considerado demasiado sensível para a maioria das aplicações. A demonstração de ácido nucleico de PCV2 por PCR não pode substituir a avaliação clínica dos suínos e avaliação microscópica dos tecidos, uma vez que muitos suínos saudáveis são positivos para PCV2 sem estarem afectados por PCVD.

A PCR é incapaz de distinguir entre infecções clínicas e subclínicas. Tendo em conta que a infecção subclínica com PCV2 é muito comum e que a infecção por PCV2 resulta em doença com sintomatologia apenas em determinadas circunstâncias, os métodos PCR não quantitativos não devem ser utilizados para diagnosticar PCVD (Segalés et al., 2005b).

A quantidade de ácido nucleico PCV2 no soro e tecidos, determinada por PCR quantitativa em tempo real, demonstrou ter um valor preditivo da evolução clínica e, portanto, pode ser útil a veterinários de campo e investigadores. Um limiar de  $10^7$  ou maior número de cópias de genoma de PCV2 por mililitro de soro está correlacionado com lesões severas associadas a PCV2 mau prognóstico. O PCR quantitativo pode ser usado para diferenciar com exactidão infecção por PCV2 de PCVD baseado na quantidade de PCV2 presentes. Assim, o resultado do PCR pode ser declarado como:

- Negativo
- Positivo sem PCVD ( $<10^6$  cópias de genoma de PCV2)
- Positivo e suspeito de PCVD ( $10^6$  cópias de genoma de PCV2)
- Positivo com PCVD ( $\geq 10^7$  cópias de genoma de PCV2) (Opriessnig et al., 2007).

#### **2.6.4.1.2. ISH e IHC**

A ISH para PCV2 utiliza uma sonda de DNA marcada que corresponde a uma parte específica do genoma do PCV2. Várias análises de ISH detectam múltiplos vírus dentro da mesma secção de tecido: PCV1/PCV2, PCV2/PRRSV e PCV2/PPV.

Na IHC utiliza-se um anticorpo monoclonal ou policlonal para detectar antígeno de PCV2 em secções de tecido fixadas com formol e embebidas em parafina.

Uma comparação entre ISH e IHC em tecidos de suínos doentes que foram armazenados durante 6 meses concluiu que ambas as técnicas foram capazes de detectar antígenos ou ácido nucleico em todos os tecidos examinados. A ISH demonstrou ser mais específica do que

IHC, especialmente, quando comparada com IHC realizadas com anticorpos policlonais (Opriessnig et al., 2007).

#### **2.6.4.1.3. Isolamento do vírus**

O isolamento do vírus não é utilizado como método de rotina no diagnóstico de PCV2 porque é um processo moroso e nem sempre eficaz. As aplicações da utilização do isolamento do vírus incluem a determinação da capacidade de infecção do PCV2 excretado no esperma e a produção de auto-vacinas (Opriessnig et al., 2007).

#### **2.6.4.2. Métodos de detecção de anticorpos**

Diversas técnicas serológicas para detecção de anticorpos para PCV2 foram desenvolvidas, nomeadamente o IPMA e o teste de imunofluorescência indirecta (IFI) baseados em culturas de células infectadas com PCV2, e métodos ELISA (placas revestidas com uma monocamada de cultura de células infectadas com PCV2 ou uma proteína da cápside de PCV2 expressa por um baculovírus). Estas são úteis para monitorizar a infecção por PCV2, mas não podem ser utilizadas para fins de diagnóstico. A maior parte destes testes foram desenvolvidos por grupos de investigação para controlar infecções por PCV2 em estudos experimentais e epidemiológicos (Segalés et al., 2005b).

A seroconversão para PCV2, medida por IPMA ou ELISA, mostra um padrão típico de infecções virais, com declínio dos anticorpos colostrais durante a lactação e recria, sendo os níveis mais baixos de anticorpos atingidos no final da recria, e seroconversão activa de quase todos os suínos durante a engorda. Em efectivos com PMWS, a mortalidade está claramente associada com a seroconversão para PCV2 e uma alta percentagem de suínos virémicos. No entanto, um padrão semelhante de seroconversão pode também ser encontrada em explorações sem PMWS. Estes dados epidemiológicos são de pouco valor, quando o objectivo é diagnosticar PMWS num único grupo de suínos (Segalés, 2002).

Embora a infecção de PCV2 seja generalizada, ainda existem algumas populações “naive” A identificação precoce dessas populações por serologia pode ser útil para determinar as estratégias adequadas para reduzir o risco de exposição ao PCV2 (Opriessnig et al., 2007).

##### **2.6.4.2.1. ELISA**

O teste ELISA é uma técnica sensível para a detecção e medição de anticorpos séricos. Recentemente, foram introduzidos na Europa testes ELISA para IgG e IgM de PCV2. Uma comparação de valores de IgG e IgM pode ser útil para determinar o momento de infecção por PCV2:

- $IgM \geq IgG$ : início infecção activa (nos primeiros 21 dias pós inoculação);
- $IgM < IgG$ : infecção activa (aproximadamente entre 20 e 50 dias pós inoculação);
- Alto valor de IgG e IgM negativo: fase tardia de infecção ou resolução por convalescença (cerca de 2 meses após a infecção).

Uma variante do ELISA normal é o ELISA competitivo (bloqueio). A prova ELISA competitiva específica para anticorpos de PCV2 está disponível na Europa. Este teste ELISA também pode ser utilizado para detectar anticorpos específicos PCV2 nas fezes (Opriessnig et al., 2007).



## **2.7. PREVENÇÃO E CONTROLO**

De entre as PCVD, o PMWS é das doenças com maior impacto económico na produção suína mundial. Esta é uma doença multifactorial, em que factores infecciosos e não infecciosos têm uma grande influência no desenvolvimento de doença clínica (Segalés et al., 2005b).

O facto de a Circovirose ser uma doença de natureza multifactorial implica que as medidas necessárias para a sua prevenção e/ou controle devam ser igualmente aplicadas a distintos níveis, com maior ou menor ênfase em cada um, dependendo da situação epidemiológica específica de cada exploração (López-Soria et al., 2008).

Antes das vacinas contra o PCV2 serem lançadas no mercado em 2006, o sucesso do tratamento e do controlo das PCVD estava centrado na optimização de boas práticas de produção minimizando o stress animal, eliminando as co-infecções ou minimizando os seus efeitos e eliminando potenciais factores de risco que induzam imuno-estimulação e que desencadeiem a progressão da infecção por PCV2 para o surgimento de PCVD (Opriessnig et al., 2007).

De seguida, serão descritas algumas medidas para prevenir ou controlar as manifestações clínicas do PCV2.

### **2.7.1. Maneio**

A correcta aplicação de algumas medidas de maneio permite aos produtores controlar parte dos problemas originados pelo PCV2. De forma a diminuir o risco do surgimento de PMWS numa exploração, várias medidas podem ser adoptadas:

- Adquirir animais de reposição apenas em varas clinicamente livres de PMWS. Requerer que o veterinário assistente da exploração de destino dos suínos comprove o estatuto sanitário da exploração de origem com o respectivo veterinário.
- Assegurar que o condutor do veículo de transporte é portador de um certificado de desinfecção de veículos selado pelo encarregado de biossegurança do vendedor. O condutor deve sempre circular com roupa e calçado adequado e limpo, mas, sempre que possível, evitar que ele entre na exploração ou se aproxime dos animais.
- Descarregar os novos animais para a quarentena e observá-los regularmente.
- Utilizar apenas desinfectantes aprovados, preferencialmente peróxidos, incluindo os rodilúvios e pedilúvios na diluição recomendada e com um nível de enchimento adequado.
- Assegurar que não existe acesso não autorizado à exploração.
- Controlo de pragas eficaz contra roedores e especialmente aves (Gadd, 2006).

Estudos efectuados em França mostraram que as explorações gravemente afectadas por PMWS apresentam, regra geral, graves deficiências de manejo. De forma a superar estas deficiências, foi criado o plano dos “20 princípios de Madec”. Este consiste na aplicação de uma lista de medidas de gestão de manejo, descritas na tabela 8, com o intuito de reduzir o impacto da doença. Estas medidas foram concebidas para reduzir a pressão de infecção do PCV2 e de quaisquer outras infecções, melhorar a higiene e reduzir o stress nas diferentes fases de produção. Foram obtidos resultados significativamente positivos, com uma forte redução das perdas, quando estas medidas foram aplicadas (Segalés et al., 2005b).

Tabela 8. Plano dos 20 princípios de Madec (adaptado de Gadd, 2006).

Maternidade	1. Esvaziamento, limpeza e desinfecção de fossas e canais de chorume. 2. Lavar as porcas e aplicar tratamentos antiparasitários. 3. Realizar adopções cruzadas apenas nas primeiras 24 horas, reduzindo-as ao mínimo, e restringindo-as no mesmo intervalo de partos. 4. Aplicar programas de vacinação adequados.
Recria	5. Pequenos compartimentos (salas), com paredes divisórias sólidas. 6. Esvaziamento, limpeza e desinfecção de fossas e canais de chorume. 7. Densidade animal: 3 suínos/m <sup>2</sup> à entrada. 8. Bebedouro com 7 centímetros por porco. 9. Assegurar uma boa ventilação. 10. Manter as temperaturas dentro dos valores padrão. 11. Não misturar diferentes grupos: um grupo (desmame de uma semana) por sala.
Engorda	12. Pequenos compartimentos (salas), com paredes divisórias sólidas. 13. Esvaziamento, limpeza e desinfecção de fossas e canais de chorume. 14. Densidade animal de 0,75m <sup>2</sup> por suíno. 15. Assegurar uma correcta ventilação e temperatura ambiente. 16. Não misturar animais de diferentes salas. 17. Não misturar animais de diferentes idades.
Outras medidas	18. Respeitar o fluxo de animais e do ar. 19. Respeitar regras de higiene aquando de intervenções como castrações, injecções, etc.. 20. Remover casos confirmados de PMWS para a enfermaria.

A limpeza e desinfecção representam medidas vitais na tentativa de eliminar agentes patogénicos de uma exploração intensiva de suínos. Para que estas medidas sejam eficazes é necessário saber quais os desinfectantes com capacidade de destruir o PCV2. Num estudo em que se investigou a susceptibilidade do PCV2 a desinfectantes, concluiu-se que Virkon® S (agente oxidante), hidróxido de sódio, Roccal® D Plus (amónio quaternário), Clorox® Bleach (hipoclorito de sódio), 1-Stroke Environ® (fenol), Fulsan® (amónio quaternário) e Tek-Trol® (fenol) reduziram significativamente os títulos virais de PCV2 (Royer et al., 2001).

Além disso, algumas medidas, relativas a limpeza e desinfecção, podem ser adoptadas na presença de evidências de infecção por PCV2:

- Implementar o sistema tudo dentro/tudo fora, especialmente nas salas de partos e na recria.
- De modo a conseguir uma correcta limpeza e desinfecção utilizando o referido sistema, certificar que as superfícies estão correctamente limpas antes de aplicar o desinfectante. Este conceito aplica-se também para os materiais descartáveis e para as fossas.
- Utilizar um detergente desencrustante/desengordurante, e deixar de molho, sobretudo em zonas de difícil acesso (fendas), durante 20-30 minutos, antes de desinfectar.
- De seguida utilizar um produto desinfectante do tipo oxidante.
- Implementar um período de repouso adequado permitindo a correcta secagem das salas antes da introdução de novos animais. Uma hipótese para acelerar este processo, particularmente no Inverno, é a utilização de um aquecedor de querosene.
- Pulverizar as superfícies superiores e fora do alcance da normal desinfecção, com um desinfectante oxidante.
- Ter especial atenção ao facto de que o PCV2 pode sobreviver nos tubos e nos tanques de água. Mais uma vez, aconselha-se a limpeza dos tanques de água e das tubagens com o recurso a um desinfectante oxidante (Gadd, 2006).

Caso a exploração esteja a ser afectada por um surto epidémico de PMWS, existem algumas medidas auxiliares para superar o problema:

- Na fase inicial da epidemia, apenas uma percentagem de ninhadas estão afectadas (10-15%). De modo a evitar o contágio de outras ninhadas e a disseminação do vírus, deve-se evitar as adopções, e utilizar apenas uma seringa por ninhada
- Verificar a estratégia de vacinação para as doenças que favorecem a disseminação do PCV2 na exploração ou que podem actuar como co-factores, como são o PPV, o vírus do PRRS e outras doenças respiratórias.
- Evitar densidades excessivas de população, currais mal ventilados, flutuações de temperatura e correntes frias.

➤ Não permitir a acumulação de sujidade nas salas de parto e recria para evitar a persistência do vírus (Gadd, 2006).

### 2.7.2. Controlo de co-infecções

As provas de campo e ensaios experimentais indicam que o diagnóstico e controlo de outros agentes infecciosos encontrados em suínos afectados por PCVD diminui a gravidade da afecção e melhora os resultados (Opriessnig et al., 2007).

Em concordância com estas observações, as tentativas de controlo de PMWS, através da vacinação contra PPV em explorações com circulação confirmada do PPV, foram bem sucedidas. Experimentalmente, a vacinação de fêmeas infectadas por PCV2 contra *Erysipelothrix rhusiopathiae* e PPV em simultâneo reduziu o número de leitões mumificados. Para além disso, os leitões nascidos de porcas infectadas por PCV2 e vacinadas foram menos susceptíveis de manifestar PMWS do que os provenientes de porcas infectadas por PCV2 e não vacinadas (Rose et al., 2007).

Relativamente ao PRRSV, um estudo realizado em explorações que apresentavam PRRS e PMWS revelou que, usando uma vacina contra PRRSV em leitões e porcas, se verificava uma redução da morbilidade e mortalidade na engorda e uma melhoria nos ganhos médios diários e índices de conversão alimentar em suínos vacinados, em comparação com os não vacinados (Kritas, Alexopoulos, Kyriakis, Tzika & Kyriakis, 2007).

No caso do micoplasma, o uso de clortetraciclina na alimentação de suínos experimentalmente infectados com *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 provou ser altamente eficaz na redução das lesões associadas a PCV2 (Opriessnig et al., 2007).

No entanto, é necessário acautelar a aplicação de vacinas, uma vez que potenciais consequências negativas podem ter origem no seu efeito imuno-estimulador, como anteriormente referido. No caso concreto da aplicação da vacina contra o *Mycoplasma hyopneumoniae*, está descrito que a sua aplicação, 2 a 4 semanas antes da provável exposição ao PCV2, evita o aumento da replicação viral (Opriessnig et al., 2006b).

De uma forma geral, os produtores com explorações afectadas por PMWS devem considerar a determinação aproximada do momento da infecção pelo PCV2, com o objectivo de alterar o calendário de vacinação, tentando assim minimizar os seus potenciais efeitos imunoestimulatórios.

Até ao momento, as medidas implementadas para tratar PMWS e PDNS através do uso de drogas não foram eficazes. Foram prescritos medicamentos para reduzir a pressão de infecção dos agentes patogénicos secundários (por exemplo, bactérias), que possam encontrar as

condições adequadas à proliferação maciça, assim que o sistema imunitário for comprometido (Madec et al., 2008).

### **2.7.3. Nutrição**

O controle parcial do PMWS foi atingido em algumas explorações do Reino Unido através de mudanças na alimentação dos suínos afectados. Estas mudanças incluíram um aumento na densidade de nutrientes das dietas de suínos jovens e a adição de aditivos comerciais para alimentos, a maioria delas com efeitos anti-oxidantes. No entanto, estes resultados não foram confirmados por outros investigadores. Está também descrito que a adição de vitamina E e/ou selénio nos alimentos para animais podem ser de benefício para as explorações com PMWS (Segalés et al., 2005b). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que o ácido linoleico conjugado melhora a resposta do organismo face à infecção do PCV2 (Bassaganya-Riera et al., 2003).

### **2.7.4. Alteração da linhagem genética**

Tendo em conta as aparentes diferenças na susceptibilidade genética de algumas raças ou linhas genéticas de suínos anteriormente referidas (López-Soria et al. 2004; Opriessnig et al., 2006a), a mudança de linha varrasco tem mostrado benefícios em casos graves de PMWS.

### **2.7.5. Seroterapia**

Antes do advento das vacinas comerciais para PCV2, alguns veterinários utilizavam seroterapia para enfrentar este vírus. O princípio desta técnica baseia-se na recolha de soros de suínos que sobrevivem à doença e que, portanto, possuem elevados títulos de anticorpos no sangue. Este soros "hiperimunes" são posteriormente injectados em leitões, com o objectivo de conferir protecção, antes do período crítico de emagrecimento. Os resultados obtidos com o uso desta técnica foram inconsistentes, e a sua utilização em larga escala deve ser desencorajada devido aos riscos para biossegurança (recirculação de agentes patogénicos entre animais) (Madec et al., 2008).

### **2.7.6. Vacinação**

O aparecimento no mercado das primeiras vacinas contra o PCV2 veio revolucionar os aspectos relacionados com a prevenção e o controlo da doença. Todas as vacinas registadas até ao momento demonstraram resultados extremamente positivos, relativamente a

diminuição da mortalidade e atrasos de crescimentos causados pelo PCV2 (López-Soria et al., 2008).

Actualmente, existem quatro vacinas registadas:

- Uma vacina inactivada para administração em reprodutoras (CIRCOVAC ®, Merial)
- Três para utilização em leitões:
  - Duas são vacinas de subunidades do vírus (PCV Porcilis ®, Intervet, e Ingelvac CircoFLEX ®, Boehringer Ingelheim)
  - Uma é baseada numa quimera do vírus PCV2-PCV1 inactivada (Suvaxyn Circus ®, Fort Dodge).

Uma descrição mais pormenorizada das vacinas existentes é apresentada na tabela 9.

Tabela 9. Características das vacinas comerciais contra PCV2

Vacina	Laboratório	Antigénio	Posologia (IM*)	Licenciamento para
CIRCOVAC ®	Merial	PCV2 inactivado	2 ml duas doses	Reprodutoras
PCV Porcilis ®,	Intervet	Proteína ORF2 de PCV2	2 ml monodose	Leitões (≥3 sem.)
Ingelvac CircoFLEX ®,	Boehringer Ingelheim	Proteína ORF2 de PCV2	1 ml monodose	Leitões (≥2 sem.)
Suvaxyn® PCV2	Fort Dodge	Quimera inactivada PCV1-PCV2	2 ml monodose	Leitões (≥4 sem.)

\* IM – Intra muscular

Apesar dos bons resultados obtidos através da aplicação de vacinas comerciais PCV2, é de importância primordial recordar que as PCVD são doenças multifactoriais. Por conseguinte, as estratégias de prevenção e controlo devem ser implementadas a diferentes níveis. Em caso de suspeita de PMWS, a primeira acção deve ser a confirmação do diagnóstico de PCV2. Depois, é necessário avaliar a influência dos potenciais factores de risco na exploração e agir sobre os que mais contribuem para o desencadeamento de doença. A aplicação de vacinas contra o PCV2, deve ser considerada após uma adequada análise custo-benefício (Madec et al., 2008).

### **3. OBJECTIVOS**

O PCV2 é responsável por prejuízos avultados em suiniculturas um pouco por todo o mundo. Além das suas manifestações clínicas mais comuns (PMWS e PDNS), que causam atrasos no crescimento e refugo de muitos suínos, este vírus interfere com a resposta imune do hospedeiro tornando-o mais susceptível a outros agentes patogénicos, aumentando os gastos em antibioterapia das explorações (muitas vezes sem sucesso). Por outro lado, tratando-se de uma doença complexa que apenas foi identificada nos finais da década de 90 e cuja manifestação clínica se assemelha a outras doenças, é-lhe muitas vezes e, erradamente, atribuída a causa de quebras de produção nas explorações intensivas de suínos.

De modo a evitar esta situação, é necessário proceder-se ao correcto diagnóstico da doença.

Por outro lado, e como atrás referido, o controlo do PCV2, entre outras medidas, é realizado através da aplicação de vacinas.

Neste contexto, o presente estudo tem como objectivos:

1. Identificar explorações intensivas de suínos com suspeita de ocorrência de PCV2.
2. Caracterizar as diferentes explorações intensivas de suínos com base na avaliação de medidas gerais de manejo, biossegurança, vacinação e outros tratamentos.
3. Identificar animais com suspeitas de doença nas explorações avaliadas e proceder ao seu diagnóstico.
4. Avaliar a transferência de imunidade contra PCV2, por reprodutoras vacinadas para leitões.
5. Implementar medidas correctivas das anomalias identificadas.

## 4. TRABALHO I – DIAGNÓSTICO DE PCV2 EM EXPLORAÇÕES INTENSIVAS DE SUÍNOS

### 4.1. METODOLOGIA

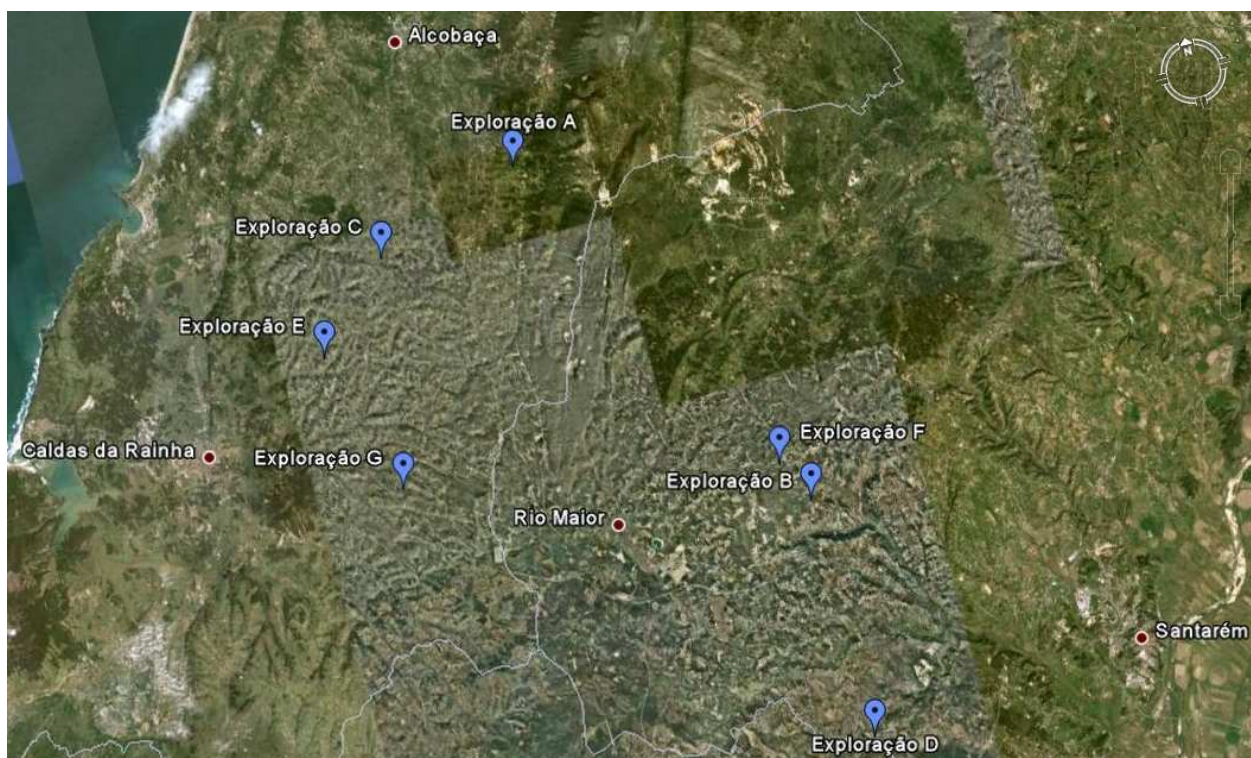
#### 4.1.1. Identificação de explorações com suspeita de doença

Numa fase inicial, diversas explorações intensivas de suínos pertencentes à Direcção de Serviços Veterinários da Região de Lisboa e Vale do Tejo foram avaliadas quanto a possível presença de sinais clínicos característicos de PCV2. Esta avaliação consistiu num exame clínico dos suínos, tentando identificar sinais característicos de PMWS ou PDNS. Nenhuma necrópsia foi realizada nesta fase.

#### 4.1.2. Localização geográfica e parâmetros de caracterização das explorações

A distribuição geográfica das explorações envolvidas neste estudo, assim como as sedes de concelho onde estão localizadas, são apresentadas na figura 6.

Figura 6 – Distribuição geográfica das explorações estudadas.



A caracterização das explorações foi realizada com base na avaliação dos parâmetros identificados na tabela 10, nomeadamente, densidade local de suínos, densidade local de explorações, tipo de exploração, medidas gerais de manejo, biossegurança, vacinação e outros tratamentos.



Tabela 10. Parâmetros utilizados na caracterização das explorações.

Exploração	
<b>Densidade local de suínos</b>	Muito elevada > 2000 suíno/km <sup>2</sup> ; Elevada 1000-2000 suíno/km <sup>2</sup> ; Média 500-1000 suíno/km <sup>2</sup> ; Baixa < 500 suíno/km <sup>2</sup>
<b>Densidade local de explorações</b>	Muito elevada > 10 explorações/km <sup>2</sup> ; elevada 5 – 10 explorações/km <sup>2</sup> ; média 1 – 5 explorações/km <sup>2</sup> ; baixa ≤ 1 exploração/km <sup>2</sup>
<b>Tipo de exploração</b>	Ciclo fechado; 1ª e 2ª fase; Engorda
<b>Medidas gerais de manejo</b>	
Desmame (dias)	21; 28
Vazio sanitário	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Tudo dentro tudo fora	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente
Mistura lotes	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente
<b>Biossegurança</b>	
Quarentena	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Balneários	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Pedilúvio	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Rodilúvio	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Controlo pragas roedores / aves	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
<b>Vacinação</b>	
Aujesky	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
PRRS	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Gripe Suína	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Mal Rubro	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
PPV	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Colibacilose	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
Micoplasma	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; * presente mas incorrecto
<b>Outros tratamentos</b>	
Antibioterapia em leitões	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente
Desparasitação engorda	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente
Antibioterapia na engorda	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente
Branqueamentos	✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente

#### 4.1.3. Selecção de suínos suspeitos

Em cada exploração foram seleccionados suínos com suspeita de infecção por PCV2. Esta selecção foi baseada na identificação de sinais clínicos, nomeadamente emagrecimento no pós-desmame, dispneia e palidez relativamente a PMWS ou manchas púrpura vermelho em relevo de diversos tamanhos e formas sobre o tórax, abdómen e coxas indicativas de PDNS. Ainda que toda a exploração fosse avaliada, a selecção dos suínos incidiu principalmente nos animais da fase final da recria e no início da engorda (8 – 12 semanas aproximadamente). Uma vez seleccionados, os suínos foram sacrificados com o auxílio de uma pistola de sacrifício de bala cativa representada na figura 7.



Figura 7. Pistola de sacrifício

#### 4.1.4. Amostragem de suínos do estudo

Neste estudo foram seleccionados animais de diferentes idades dentro de cada exploração como identificado na tabela 11.

Tabela 11. Número de suínos seleccionados por exploração e respectiva idade

Exploração	Nº de suínos e idade
A	3 suínos com 10 semanas e 2 suínos com 8 semanas.
B	4 suínos com 10 semanas
C	3 suínos com 8 semanas, 1 suíno com 12 semanas e 3 amostras de corações de nados-mortos.
D	5 suínos com 12 semanas
E	1 suíno com 12 semanas e colheita de órgãos de um cadáver recente (suíno com 14 semanas)
F	4 suínos com 8 semanas e 1 suíno com 14 semanas
G	4 suínos com 10 semanas e 1 suíno com 12 semanas

Os animais provenientes da exploração E foram os únicos seleccionados com sinais de PDNS. Os restantes apresentavam sinais indicativos de PMWS, como, por exemplo, o animal da Figura 8 que apresentava um claro atraso de crescimento.



Figura 8. Exemplo de animal seleccionado com 8 semanas, com suspeita de PMWS

#### 4.1.5. Colheita e envio de amostras para o laboratório

Após a selecção e sacrifício, os animais foram necropsiados. As necrópsias foram realizadas com o objectivo de proceder à colheita de órgãos para envio para o laboratório, e, por essa razão, apenas se avaliou o aspecto geral da cavidade torácica e abdominal e seus principais órgãos. A necrópsia era iniciada com cortes na região das axilas de modo a rebater os membros torácicos e na região das virilhas para rebater os membros pélvicos. De seguida, efectuava-se um corte na zona do apêndice xifóide e destacava-se o esterno das costelas, com o rebatimento das mesmas. Por fim, prolongavam-se os cortes iniciados na cavidade torácica pela cavidade abdominal até a região pélvica. O resultado final pode ser observado na figura 9.

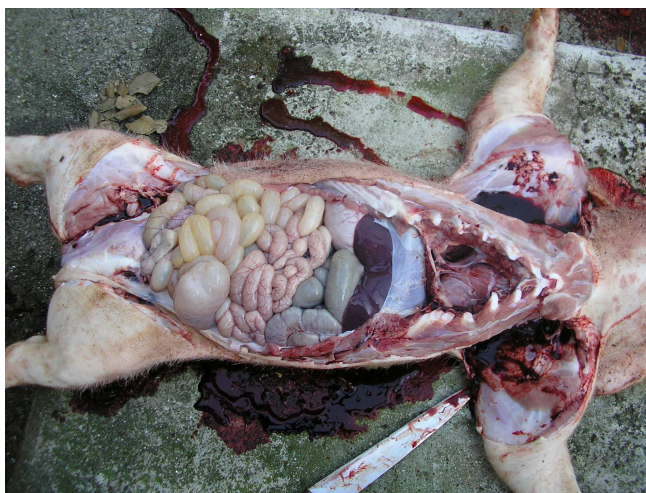


Figura 9. Carcaça de suíno após rebatimento dos membros e exposição das cavidades torácica e abdominal.

Procedia-se então à recolha de porções dos órgãos: linfonodo inguinal, pulmão, coração, fígado, rim, baço e, por vezes, linfonodos mesentéricos com porções de intestino. As amostras

de cada suíno foram armazenadas em formol a 10%, individualmente, em recipientes de plástico com tampa de rosca previamente identificados, e cobertas por uma porção de algodão de modo a que as fracções de pulmão flutuantes ficassem totalmente em contacto com o formol.

Finalmente as caixas eram agrupadas, seladas com fita adesiva, acondicionadas com material adequado (anti-choque) e enviadas para o Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) da Universidade Autónoma de Barcelona para avaliação do quadro lesional microscópico e pesquisa de PCV2 por ISH.

#### **4.1.6. Descrição sumária da técnica de ISH**

A técnica de ISH baseia-se no facto do DNA ter a capacidade de estabelecer ligações de hidrogénio com sequências complementares. Marcando sequências de DNA de comprimento suficiente, podem-se obter sondas para detectar sequências específicas de DNA. A aplicação destas sondas em secções de tecido em parafina permite a detecção de DNA no tecido e nos diferentes tipos celulares.

Em resumo, esta técnica consiste em diferentes fases (Choi & Chae, 1999):

1. Selecção de um tipo de sonda – neste caso utilizou-se um fragmento de DNA de 530 pares de bases obtido a partir da ORF1.
2. Marcação da sonda com digoxigenina
3. Permeabilização celular com proteinase K
4. Fixação dos tecidos – solução de formaldeído a 4%
5. Hibridação – incubação de uma pequena quantidade de solução contendo a sonda de hibridação com os cortes de tecido durante a noite (40°C).
6. Lavagem – após incubação, realizam-se lavagens sucessivas para remover as sondas que não se ligaram ao DNA alvo.
7. Detecção de hibridação:
  - a. Incubação do conjugado – as secções de tecido são incubadas com conjugado anti-digoxigenina/fosfatase alcalina
  - b. Reacção enzimática – após nova lavagem, a amostra é revelada através da adição de um substrato, que é transformado num produto colorido pela fosfatase alcalina.
  - c. Coloração de contraste – após a reacção enzimática as secções de tecido são coradas com verde metil 0,5%.

As células positivas geralmente exibem um produto de reacção com uma coloração castanho-escuro a negra, principalmente no citoplasma, mas ocasionalmente no núcleo, como demonstrado na figura 10. A intensidade da coloração e dispersão nos tecidos correlaciona-se com a carga viral.

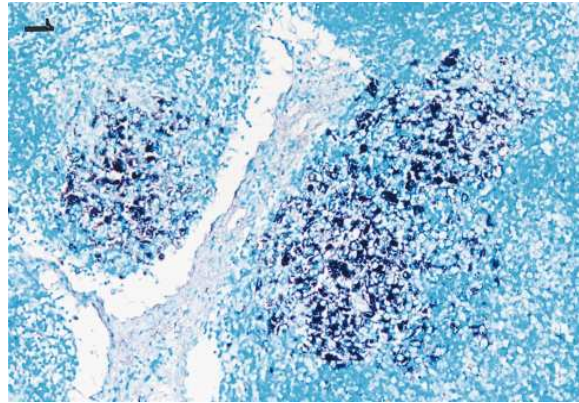


Figura 10. Linfonodo de suíno com infecção natural de PCV2. Sinais de hibridação positiva para os ácidos nucleicos de PCV2 surgem nas células mononucleares dos centros germinativos. Sinais de hibridação são vistos como pequenos grãos negros. Ampliação de 100x. (Adaptado de Choi & Chae, 1999).

A ISH é uma técnica de eleição que permite o estudo da distribuição e localização de sequências de DNA específicas numa população celular heterogénea.

## **4.2. RESULTADOS**

### **4.2.1. Caracterização das explorações seleccionadas**

A descrição das explorações seleccionadas obtida através da avaliação dos diferentes parâmetros (densidade local de suínos, densidade local de explorações, tipo de exploração, medidas gerais de manejo, biossegurança, vacinação e outros tratamentos) apresenta-se de forma resumida na tabela 12. Uma descrição mais detalhada das explorações pode ser encontrada no Anexo 1.

Tabela 12. Caracterização das explorações seleccionadas.

	Exp. A	Exp. B	Exp. C	Exp. D	Exp. E	Exp. F	Exp. G
<b>Densidade local de suínos</b>	Muito elevada	Elevada	Baixa	Elevada	Baixa	Elevada	Baixa
<b>Densidade local de explorações</b>	Muito elevada	Elevada	Média	Média	Baixa	Elevada	Baixa
<b>Tipo de exploração</b>	Ciclo fechado	Ciclo fechado	Ciclo fechado	Engorda	Engorda	Ciclo fechado	Ciclo fechado
<b>Medidas gerais de manejo</b>							
Desmame (dias)	28	28	21	21	—	21	28
Vazio sanitário	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓
Tudo dentro tudo fora	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗
Mistura lotes	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
<b>Biossegurança</b>							
Quarentena	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
Balneários	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
Pedilúvio	✗	✓	✓	✗	*	✓	✓
Rodilúvio	✗	✓	✓	*	*	✓	*
Controlo pragas roedores / aves	✓/✓	✓/✗	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓	✓/✓
<b>Vacinação</b>							
Aujesky	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓
PRRS	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✗
Gripe Suína	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Mal Rubro	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
PPV	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
Colibacilose	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✓
Micoplasma	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
<b>Outros tratamentos</b>							
Antibioterapia em leitões	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗
Desparasitação engorda	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Antibioterapia na engorda	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓
Branqueamentos	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✓

Legenda: ✓ - presente / correcto ; ✗ - ausente ; \* presente mas incorrecto.

## **4.2.2. Resultados da prova ISH e avaliação do quadro lesional microscópico**

### **4.2.2.1. Exploração A**

Em nenhum dos suínos seleccionados nesta exploração foi possível identificar a presença de PCV2 na prova de ISH. A análise microscópica revelou a presença em todos os suínos de uma pneumonia intersticial subaguda, que variava de multifocal a difusa e de leve a intensa, acompanhada, em alguns dos casos, de broncopneumonia catarral-purulenta. Nos restantes órgãos não se verificaram alterações significativas, à excepção de uma ligeira depleção linfocitária em três dos suínos.

### **4.2.2.2. Exploração B**

Dos 4 suínos seleccionados, 2 foram positivos para PCV2, com baixa quantidade de genoma viral nos linfonodos, na prova de ISH. Estes animais apresentavam em comum uma ligeira depleção linfocitária com infiltração histiocitária. Um dos suínos apresentava uma pneumonia intersticial subaguda multifocal associada a broncopneumonia catarral-purulenta, e o outro apresentava hepatite mononuclear periportal moderada. Os animais negativos apresentavam uma broncopneumonia catarral-purulenta.

### **4.2.2.3. Exploração C**

Todos os suínos seleccionados nesta exploração foram negativos para a detecção de PCV2, na prova de ISH. A análise microscópica, mais uma vez, revelou a presença de pneumonia intersticial subaguda em todos os animais e uma ligeira depleção linfocitária em dois dos suínos. As amostras de corações de nados-mortos não apresentavam alterações.

### **4.2.2.4. Exploração D**

Foi possível detectar infecção por PCV2 em todos os suínos provenientes desta exploração, na prova de ISH. Não obstante, todos os suínos apresentavam níveis baixos de ácido nucleico viral. Todos os animais apresentavam a mesma lesão microscópica pulmonar, pneumonia intersticial subaguda multifocal leve a moderada. Três dos suínos apresentavam lesões hepáticas que variavam de uma ligeira hepatite mononuclear periportal a necrose hepática centrolobular intensa. Observou-se ainda pleuresia fibrinosa num dos suínos, nefrite intersticial subaguda multifocal noutro suíno e ligeira broncopneumonia catarral purulenta num terceiro.

#### **4.2.2.5. Exploração E**

Ambos os animais seleccionados nesta exploração apresentavam quantidades ligeiras a moderadas de genoma de PCV2 nos órgãos linfoides, na prova de ISH, e depleção linfocitária com infiltração histiocitária. As amostras provenientes do cadáver revelaram que este suíno sofria de uma pneumonia intersticial subaguda e broncopneumonia catarral-purulenta. Associada aos sinais clínicos de PDNS, observou-se a presença de glomerulite fibrino-necrosante com nefrite intersticial subaguda multifocal leve a moderada e vasculite necrosante sistémica. O outro suíno proveniente desta exploração apresentava pneumonia proliferativa necrosante, perivasculite e vasculite mesentérica mononuclear intensa, ligeira hepatite mononuclear multifocal e moderada nefrite intersticial subaguda.

#### **4.2.2.6. Exploração F**

Em nenhum dos cinco suínos com origem nesta exploração foi possível detectar a presença de PCV2, na prova de ISH. As lesões encontradas nestes suínos localizavam-se principalmente nos pulmões, variando de pneumonia intersticial subaguda multifocal ligeira a pneumonia bronquiolo-intersticial moderada. Dois dos suínos apresentavam lesões hepáticas, ligeira hepatite mononuclear multifocal irregular, e observaram-se ainda lesões nas serosas, nomeadamente pleuresia fibrinosa num dos suínos e peritonite fibrinosa (com envolvimento do baço e fígado) noutro.

#### **4.2.2.7. Exploração G**

Quatro dos suínos seleccionados nesta exploração foram positivos para infecção por PCV2, na prova de ISH, dois dos quais apresentavam ligeira depleção linfocitária com infiltração histiocitária dos linfonodos.

Três destes suínos possuíam lesões microscópicas, a nível pulmonar, caracterizadas por pneumonia intersticial subaguda difusa moderada e broncopneumonia catarral-purulenta. No outro suíno positivo para PCV2, identificaram-se focos de necrose encapsulados no pulmão e fígado. O quinto suíno era negativo para infecção por PCV2 e não revelou qualquer alteração a análise histológica.

Os resultados obtidos na prova de ISH são apresentados sumariamente na tabela 13.



Tabela 13. Resultados da prova de ISH.

<b>Exploração</b>	<b>Nº de suínos</b>	<b>Resultado</b>	
		Positivo	Negativo
A	5	0	5
B	4	2	2
C	4 e amostras de corações de nados mortos.	0	5
D	5	5	0
E	1 + um cadáver recente	2	0
F	5	0	5
G	5	4	1
<b>Total</b>	<b>29 + cadáver + corações de nados mortos</b>	<b>13</b>	<b>18</b>

### 4.3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A realização deste estudo permitiu identificar a presença de infecção por PCV2 em quatro das sete explorações investigadas (B, D, E e G). Foram identificadas lesões microscópicas a nível pulmonar em 86,7% das amostras analisadas (26/30). Destas, 46,2% (12/26) foram atribuídas a infecções bacterianas pulmonares. Estes dados vêm reforçar que as doenças do Complexo Respiratório Suíno, do qual o PCV2 faz parte, e que é responsável por elevadas perdas económicas no sector suinícola, tem uma prevalência muito elevada, nas explorações intensivas de suínos

A generalidade dos suínos positivos para PCV2 apresentavam baixas quantidades de genoma viral nos linfonodos, nomeadamente os suínos provenientes das explorações B, D e G. Estes resultados dificultam a interpretação mas, como referido por Segalés (2002), podem dever-se a: forma subclínica da doença, fase inicial da infecção ou numa fase de convalescença.

Tomando em consideração as características identificadas nas explorações onde foram observados sinais clínicos presuntivos de infecção por PCV2 e os resultados laboratoriais obtidos, implementaram-se diversas medidas correctivas como seguidamente se descreve.

No caso da **Exploração B**, existiam diversas falhas de manejo, nomeadamente densidade excessiva de animais na recria e engorda, falhas de vacinação das reprodutoras e vazios sanitários deficientes. Na engorda observavam-se casos pontuais (<1%) de suínos com sinais

clínicos típicos de PDNS, nomeadamente, manchas vermelho-púrpura localizada maioritariamente na região pélvica e perineal. Tendo em conta que apenas dois animais foram positivos e com baixos níveis de genoma de PCV2 nos linfonodos e as deficientes condições de manejo, a infecção por PCV2 foi considerado um problema secundário e foi aconselhado ao produtor que optimizasse o manejo da exploração, mais concretamente através da redução da densidade animal, correcta realização dos vazios sanitários e actualização da vacinação das reprodutoras.

Na **Exploração D**, a situação era bem diferente. Neste caso, as medidas de manejo da exploração de origem dos animais eram correctas e nenhuma grande falha poderia ser apontada. O mesmo não se pode dizer da biossegurança uma vez que decorriam obras de melhoramento e verificava-se a entrada e saída de pessoal alheio a exploração. No entanto, o facto de 100% dos suínos serem positivos para o PCV2 associado a presença de lesões típicas de PMWS nos fígados de três dos animais, levou a julgar que este era um problema real e cujo controlo deveria ser uma prioridade. Os baixos níveis de genoma viral presentes nos linfonodos podem, neste caso, ser explicados pela idade dos animais. Os suínos provenientes desta exploração tinham cerca de 12 semanas de idade e muito provavelmente estariam numa fase convalescente da enfermidade. Neste caso, foi aconselhado ao produtor a instauração de um programa vacinal contra o PCV2. Esta medida serviria não só para controlar os prejuízos causados pelo PCV2 mas também, hipoteticamente, como medida auxiliar no controlo dos graves problemas que esta exploração sofria devido a infecção por *Haemophilus parasuis* (doença de Glässer). Esta afirmação é baseada na acção imunossupressora/imunomoduladora do PCV2, descrita na revisão bibliográfica, que facilita a infecção por outros agentes patogénicos e dificulta o seu controlo. Um teste vacinal foi aplicado nesta exploração, mas apenas em Maio de 2009, pelo que não é possível apresentar os resultados desse teste neste trabalho.

Em relação à **Exploração G**, verifica-se um problema difícil de contornar: as instalações. Esta é uma exploração muito antiga e com graves deficiências de construção não permitindo uma clara separação quer entre os diferentes sectores quer entre as diferentes salas. As condições ambientais são também elas deficitárias, com ausência de luminosidade adequada em alguns dos sectores e ventilação insuficiente em toda a exploração. Por outro lado, esta exploração era afectada por disenteria suína (*Brachyspira hyodysenteriae*) na engorda. Neste caso, a infecção por PCV2 foi considerada subclínica uma vez que os sinais clínicos manifestados pelos suínos seleccionados não eram muito evidentes. Devido a toda a conjuntura da exploração, nenhuma medida direccionada ao controlo do PCV2 foi tomada.

Dos suínos utilizados neste estudo, os da **Exploração E** foram os que apresentaram um resultado mais conclusivo. As amostras recolhidas do cadáver desta exploração revelaram que este suíno padecia de PDNS com infecção por PCV2. Esta afirmação foi baseada nos achados da necrópsia (presença de lesões típicas na zona pélvica), nos resultados da análise microscópica onde se identificaram as lesões típicas de PDNS (glomerulonefrite fibrinosa e necrosante e vasculite sistémica necrosante) e no resultado do teste por ISH. No outro animal, as lesões microscópicas eram semelhantes, mas numa fase mais precoce do seu desenvolvimento. Este animal foi também considerado positivo com base nas lesões microscópicas dos órgãos linfoides e na presença de genoma de PCV2 nos tecidos. Não obstante, em 3000 animais presentes nesta exploração, estes foram os únicos suspeitos de infecção por PCV2.

No entanto, suspeitou-se nesta exploração que os suínos, negativos para PRRS, contraíam a doença após a entrada na fase de engorda com manifestação de sinais de patologia respiratória como tosse intensa, dispneia e inapetência. Estas suspeitas foram confirmadas após a realização de serologias que revelaram que, pouco depois da entrada na engorda, os animais apresentavam títulos elevados de PRRS. Por este motivo, e devido a baixa prevalência de animais com sintomatologia de PCV2 (<0,1%), não foram tomadas medidas contra a infecção por este agente.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam os conhecimentos sobre epidemiologia e dinâmica de infecção por PCV2 nas explorações intensivas de suínos em Portugal. Neste contexto verificou-se que a infecção por PCV2 ocorre independentemente da localização da exploração (zona de elevada ou baixa densidade de suínos/explorações), medidas gerais de manejo, biossegurança e planos de vacinação. Por outro lado os resultados obtidos pela prova ISH poderão não refletir a real gravidade da infecção por PCV2 devido às limitações inerentes à mesma.

De forma a otimizar o rendimento das explorações intensivas de suínos, deve existir uma adequada monitorização da infecção por PCV2 através de um correcto diagnóstico clínico confirmado por provas de diagnóstico laboratorial adequadas.

## **5. TRABALHO II – BREVE ESTUDO SOBRE TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE DE REPRODUTORAS VACINADAS (CIRCOVAC®) À DESCENDÊNCIA**

### **5.1. INTRODUÇÃO**

Com o objectivo de avaliar a transferência de imunidade contra PCV2 de reprodutoras à sua descendência realizou-se o presente estudo de pesquisa de anticorpos anti PCV2 em porcas e leitões de diferentes idades em duas explorações intensivas de suínos do concelho de Alcobaça onde se efectuava a vacinação das reprodutoras com CIRCOVAC®.

A exploração 1 está localizada numa zona de elevada densidade de explorações suinícolas e possui uma longa história de elevadas taxas de mortalidade (cerca de 10%), atrasos de crescimento na recria e na engorda e infecções bacterianas resistentes à antibioterapia com avultados prejuízos para o produtor. Ainda que não tenham sido realizadas análises para o comprovar, o veterinário assistente da exploração, com base na sintomatologia exibida pelos suínos, suspeitava que o PCV2 fosse o responsável pelos problemas observados. Pouco tempo depois da Merial lançar a vacina CIRCOVAC® em Portugal, o veterinário assistente em conjunto com o produtor decidiram iniciar a vacinação das reprodutoras. Relatos conjuntos do produtor e veterinário assistente atestam as melhorias verificadas após a instauração da vacinação, nomeadamente diminuição da taxa de mortalidade, quer na engorda, quer na recria, maior homogeneidade dos lotes na engorda, diminuição da antibioterapia instituída e menor idade dos animais ao abate.

No entanto, na engorda desta exploração verificou-se o ressurgimento de infecções bacterianas resistentes a antibioterapia.

A exploração 2 situa-se numa zona de baixa densidade de explorações suinícolas e não apresentava indícios de infecção por PCV2. No entanto, por sugestão do produtor, iniciou-se a vacinação das reprodutoras. As alterações não foram tão exuberantes como no caso anterior, ainda assim, na opinião do veterinário assistente e do produtor, verificou-se uma ligeira melhoria na homogeneidade dos lotes na engorda.

Na exploração 2, observou-se que uma grande percentagem de reprodutoras apresentava abscessos no local de inoculação das vacinas (em cerca de 10-15% dos animais estes eram visíveis e em 20-25% eram palpáveis). Sabendo que o CIRCOVAC® é uma vacina particularmente reactiva, caso não seja correctamente administrada, e tendo em conta que era o produtor a fazer essa mesma administração, surgiu a dúvida se os abscessos estariam a interferir com a transferência da imunidade.

## 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Como acima referido o estudo foi realizado em reprodutoras e leitões de cada exploração, seleccionados do seguinte modo:

- 20 reprodutoras agrupadas em quatro categorias: cinco marrãs vacinadas, cinco porcas de primeira ou segunda barriga, cinco porcas de terceira ou quarta barriga e cinco porcas com cinco ou mais barrigas.
- 10 leitões agrupados em duas categorias: cinco animais com três semanas (um por ninhada) e em cinco com seis semanas (um por ninhada).

Colheram-se amostras de sangue total da veia jugular dos animais seleccionados, que foram armazenadas, identificadas individualmente e por exploração e enviadas para o Laboratoire de Développement et D'Analyses, em França, onde se realizaram provas de ELISA por bloqueio, para identificação de níveis de anticorpos contra PCV2.

Estas provas são realizadas em diferentes fases (Anexo 2):

1. Incubação da amostra – Amostras de soros controlo (positivo e negativo) e de soros em estudo são distribuídas em microplacas de 96 alvéolos apropriadas, previamente revestidas com anticorpos anti-PCV2 ligados a antígeno de PCV2 purificado e incubados durante uma hora a 37°C.
2. Incubação do conjugado – Após uma etapa de lavagem para eliminar as fracções não-associadas, adiciona-se anticorpo anti-PCV2 conjugado com peroxidase e procede-se à incubação durante uma hora a 37°C
3. Reacção enzimática – Depois de uma segunda etapa de lavagem, as amostras são reveladas através da adição de um substrato apropriado, que é transformado num produto colorido pela peroxidase.
4. Leitura – As densidades ópticas são registadas e utilizadas para determinar a presença ou ausência de anticorpos. A leitura é realizada a uma densidade óptica de 450/630 nm.
5. Validação do teste – os resultados são válidos se:
  - A  $\overline{OD}$  do controlo negativo  $> 0,500$
  - A  $\overline{OD}$  do controlo positivo  $< 0,300$
6. Expressão e interpretação dos resultados – o método utilizado para o cálculo e interpretação é baseado no seguinte modelo:

$$\text{Log(Titer)} = a + b \times \text{Logit(SNc)} \quad \text{ou} \quad \text{Titer} = 10^{(a + b \times \text{Logit(SNc)})}$$

Em que,  $a = 2,5$   $b = -0,7$  SNc – Sample to Negative corrected ratio

Os resultados obtidos são expressos em unidades de ELISA log 10

Na fase 1, se estiverem presentes anticorpos anti-PCV2 na amostra, estes ligam-se ao antígeno. Na fase 2, se não houver anticorpos anti-PCV2 na amostra, o conjugado anti-PCV2/peroxidase liga-se ao antígeno.

O nível de resposta (unidades de ELISA log 10) é comparado com os resultados previamente obtidos em porcas e leitões de explorações padrão, vacinadas com CIRCOVAC e sem sintomas de PCV2 (valores de referência da MERIAL).

### 5.3. RESULTADOS

Na exploração 1, verificou-se que os níveis de anticorpos em marrãs e porcas com uma a duas barrigas estavam em conformidade com os valores de referência da MERIAL. No entanto, verifica-se uma quebra nos níveis de anticorpos contra PCV2 em porcas com três a quatro barrigas e em porcas com cinco ou mais barrigas, quando comparados com aqueles valores (Figura 11).

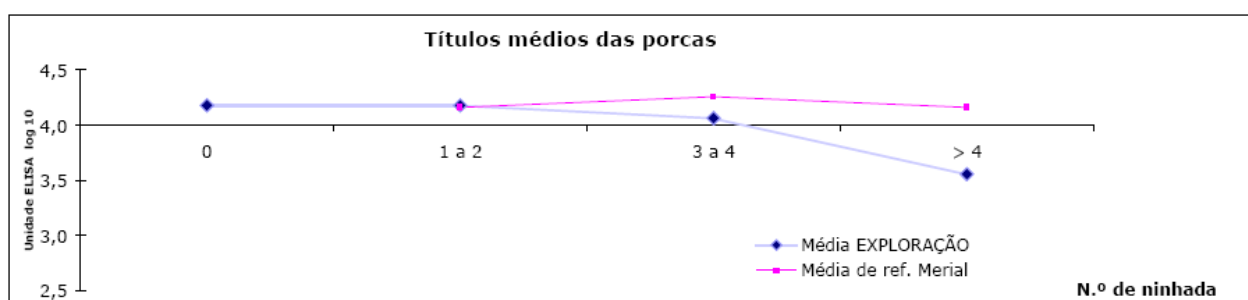


Figura 11. Níveis de anticorpos contra PCV2 em reprodutoras da exploração 1. Os resultados são representados como títulos médios de anticorpos para PCV2 em marrãs (0), porcas com uma a duas barrigas (1 a 2), porcas com três a quatro barrigas (3 a 4), e porcas com cinco ou mais barrigas (>4) da exploração 1. Os valores a azul representam as médias obtidas na exploração 1 enquanto que os valores a rosa representam os valores de referência da MERIAL.

Relativamente aos leitões de 3 e de 6 semanas, verificaram-se níveis de anticorpos contra PCV2 semelhantes aos valores de referência da MERIAL (Figura 12).

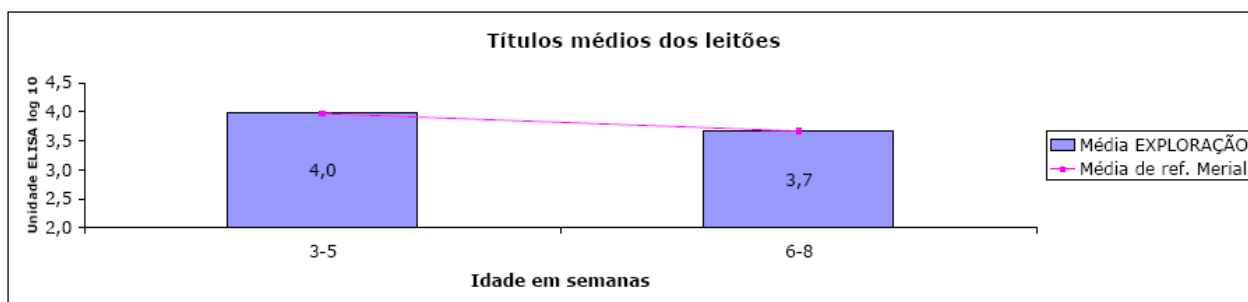


Figura 12. Níveis de anticorpos contra PCV2 em leitões da exploração 1. Os resultados são representados como títulos médios de anticorpos para PCV2 nos leitões de três semanas (3-5) e dos leitões de seis semanas (6-8) da exploração 1. Os valores a azul representam os títulos médios da exploração 1 e a rosa representam os valores de referência da MERIAL.

Na exploração 2, verificou-se que os níveis de anticorpos em marrãs e porcas com cinco ou mais barrigas estavam em conformidade com os valores de referência da MERIAL. Nas porcas com uma a duas barrigas e porcas com três a quatro barrigas, verifica-se uma ligeira diminuição nos níveis de anticorpos contra PCV2, quando comparados com aqueles valores (Figura 13).

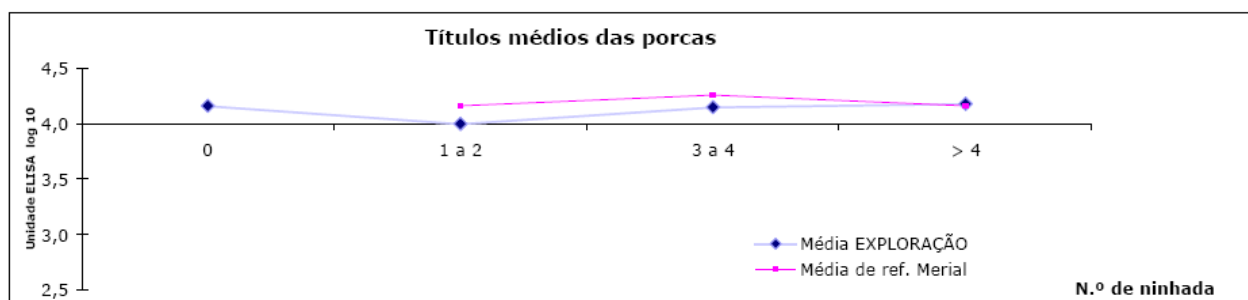


Figura 13. Níveis de anticorpos contra PCV2 em reprodutoras da exploração 2. Os resultados são representados como títulos médios de anticorpos para PCV2 em marrãs (0), porcas com uma a duas barrigas (1 a 2), porcas com três a quatro barrigas (3 a 4), e porcas com cinco ou mais barrigas (>4) da exploração 2. Os valores a azul representam as médias obtidas na exploração 2 enquanto que os valores a rosa representam os valores de referência da MERIAL.

Relativamente aos leitões de 3 e de 6 semanas, verificaram-se níveis de anticorpos contra PCV2 semelhantes aos valores de referência da MERIAL (Figura 14).

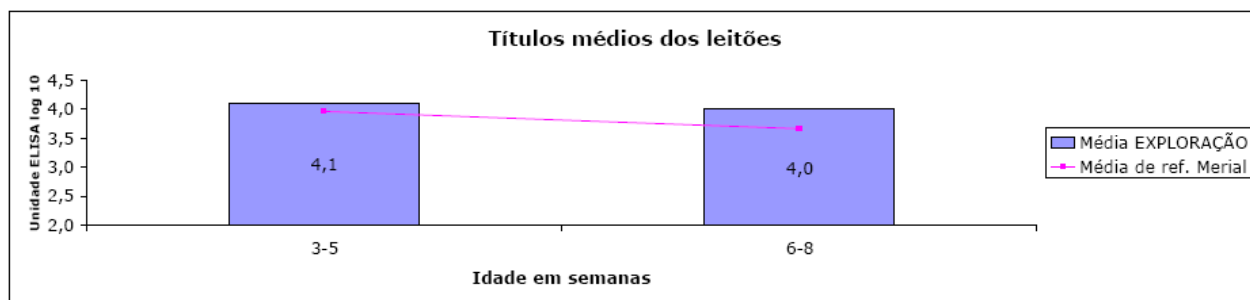


Figura 14. Níveis de anticorpos contra PCV2 em leitões da exploração 2. Os resultados são representados como títulos médios de anticorpos para PCV2 nos leitões de três semanas (3-5) e dos leitões de seis semanas (6-8) da exploração 2. Os valores a azul representam os títulos médios da exploração 2 e a rosa representam os valores de referência da MERIAL.

## 5.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na exploração 1, verificou-se uma seroconversão heterogênea e insuficiente em reprodutoras, em que uma delas apresentava títulos de anticorpos perto de zero. Observou-se ainda um nível inferior do título médio em porcas com três a quatro barrigas e em porcas com cinco ou mais barrigas, em relação aos valores de referência. Relativamente aos leitões, observou-se uma excelente homogeneidade, às três e seis semanas, o que reflecte uma boa transferência de anticorpos pelo colostro, relativamente aos valores de referência.

Nesta exploração, 20% das reprodutoras apresentavam títulos baixos de anticorpos vacinais pelo que a imunidade conferida por estas porcas à sua descendência não será suficiente. No entanto, os leitões possuíam títulos dentro dos valores de referência. Nesta exploração, e tendo em conta o seu historial, foi aconselhada uma re-avaliação do plano de vacinação de modo a otimizar a imunidade pós-vacinal.

No caso da exploração 2, foi visível uma ligeira heterogeneidade nos níveis de anticorpos das porcas de uma a duas barrigas e de três a quatro barrigas com uma ligeira diminuição do título médio, relativamente a valores de referência. Os títulos de anticorpos revelaram uma excelente homogeneidade em leitões de três e seis semanas, relativamente aos valores de referência, o que significa uma correta transferência colostrá.



Concluiu-se que os abscessos observados na exploração 2 não tiveram influência na eficácia vacinal, observando-se uma boa protecção dos leitões. Não obstante, duas das reprodutoras revelaram títulos abaixo dos de referência, pelo que se aconselhou ao produtor uma maior atenção no acto da vacinação, nomeadamente, através de:

- Verificação dos procedimentos de esterilização;
- Verificação da metodologia de administração da vacina;
- Reconstituição da vacina 1 hora antes da vacinação, mantendo-a à temperatura ambiente;
- Utilização de agulhas de 1,25 polegadas para marrãs e de 1,5 polegadas para porcas com um diâmetro entre 21 e 20 G.

Os resultados deste breve estudo, embora fidedignos relativamente às metodologias de diagnóstico utilizadas, não permitem fazer uma avaliação da real situação das explorações em virtude de se ter utilizado um número relativamente reduzido de amostras

A transferência de imunidade maternal contra agentes infecciosos, nomeadamente contra o PCV2, é de extrema impotência na manutenção dos estatutos sanitários dos efectivos.

Torna-se necessário que esta avaliação seja estendida a uma maior número de explorações, utilizando amostragens significativas, em condições diversas para que se apliquem os planos profiláticos mais adequados.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O PCV2 é actualmente um agente disseminado por todo o mundo e que causa elevados prejuízos em suinicultura. Estes prejuízos devem-se, não apenas às suas manifestações clínicas mais clássicas e que causam elevadas taxas de mortalidade e refugo, mas também pelo facto de ser um agente capaz de facilitar a entrada de outros impedindo o hospedeiro de montar uma resposta imune adequada.

Antes de surgirem as vacinas contra o PCV2, que apresentam resultados extremamente positivos, o controlo deste agente passava pela optimização das medidas de manejo. A suinicultura evoluiu bastante nos últimos anos em termos de tecnologia, genética, alimentação, vacinação, mas nenhuma destas evoluções pode descurar aquele que é o principal “pilar” da suinicultura, o manejo. O advento do PCV2 veio, de certa forma, despertar os produtores para a gravidade das deficiências de manejo e o impacto negativo que estas podem ter numa exploração.

Muitos autores defendem que o PCV2 isoladamente não consegue induzir doença. Ou seja, as manifestações clínicas provocadas por este agente necessitam de factores desencadeantes.

Esta nova realidade que representam as doenças multifactoriais é um desafio para produtores e veterinários. Não é possível encarar estas doenças como consequência da infecção por parte de um agente patogénico, mas como reflexo de uma conjugação de factores (deficiências de manejo, instalações, estatuto imunitário das reprodutoras, outras infecções) que levou ao surgimento da doença.

## BIBLIOGRAFIA

- Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A.C., Adair, B., Ellis, W.A., McNulty, M.S. (1995). Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology*, 44, 49-64.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by Co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 121, 1-11.
- Allan, G.M., Ellis, J.A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 3-14.
- Bassaganya-Riera, J., Pogranichniy, R.M., Jobgen, S.C., Halbur, P.G., Yoon, K.J., O'Shea, M., Mohede, I., Hontecillas, R. (2003). Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. *Journal of Nutrition* 133: 3204-3214.
- Calsamiglia, M., Fraile, L., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martín, M., Mateu, E., Domingo, M., Segalés, J. (2007). Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Research in Veterinary Science*, 82, 299-304.
- Chae, C. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Veterinary Journal*, 168, 41-49.
- Choi, C., Chae, C. (1999). In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Compared Pathology*, 121, 265-270.
- Clark, E.G., Ellis, J.A., Allan, G.M., Krakowka, S. (2004). Post-weaning multi-systemic wasting syndrome in swine. In J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin, *Infectious Diseases of Livestock*, (2nd ed.). (pp. 1373-1386). Cape Town, Southern Africa: Oxford University Press.
- Delogu, M., Cordioli, P., Sala, G., Caprioli, A., Ostanello, F., De Marco, M.A., Macrì, R., Obber, F., Marata, A., Zengarini, M. (2005). Seroprevalence against PCV2 in demographic managed wild boars (*sus scrofa*) in the gessi bolognesi regional park, emilia-romagna region, northern Italy. In *Proceedings of an International Conference on "Animal Circoviruses and Associated Diseases"*, Belfast, Northern Ireland, 11-13 September, pp. 85.
- Drolet, R., Thibault, S., D'Allaire, S., Thomson, J.R., Done, S.H. (1999). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Swine Health and Production*, 7 (6), 283-285
- Ellis, J., Spinato, M., Yong, C., West, K., McNeilly, F., Meehan, B., Kennedy, S., Clark, E., Krakowka, S., Allan, G. (2003). Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, 364-368.

- Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan G.M. (2004). Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology* 98, 159-163.
- Fort, M., Fernandes, L.T., Nofrarias, M., Díaz, I., Sibila, M., Pujols, J., Mateu, E., Segalés, J. (2009). Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, doi:10.1016/j.vetimm.2008.12.024
- Gadd, J. (2006). PMWS. In *Producción porcina, John Gadd descubre Lo que los libros de texto no cuentan*. (pp. 217-224). Saragoça, Espanha: SERVET.
- Grau-Roma, L., Segalés, J. (2007). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Veterinary Microbiology*, 119, 144-151.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., López-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segalés, J. (2008). A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology*, 128, 23-35.
- Ha, Y., Ahn, K.K., Kim, B., Cho, K.-D., Lee, B.H., Oh, Y.-S., Kim, S.-H., Chae, C. (2009). Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. *Research in Veterinary Science*, 86, 108–110.
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P.S. (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, 72 (6), 5262–5267.
- Hardge, T., Gaumann, H., Hasberg, W., Lange, S. (2003). The economic impact of PMWS in the nursery – review of a successful control program. In *Proceedings of 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases – Rome June 29th – July 2nd, 2003*, pp.203-204.
- Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segalés, J., Baumgaertner, W. (2009). Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2009.02.005
- Junqueira, L.C., Carneiro, C., (1999). Sistema imunitário e órgãos linfáticos. In *Histologia Básica*, 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kawashima, K., Tsunemitsu, H., Katsuda, K. (2003a). Epidemiological situation of PMWS in Asia. In *PCV2 Diseases: Intimate relationships between host and pathogen & a close-up on Asia*. (pp. 45-53). White Book: Merial
- Kekarainen, T., Montoya, M., Mateu, E., Segalés, J. (2008). Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *Journal of General Virology*, 89, 760-765.

- Kennedy, S., Segalés, J., Rovira, A., Scholes, S., Domingo, M., Moffett, D., Meehan, B., O'Neill, R., McNeilly, F., Allan, G. (2003). Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, 151–156.
- Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Chae, C. (2004). Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 68 (3) 218–221.
- Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Rigler, S., Rigs, D.M., Allan, G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in production of wasting disease in pigs infected with PCV2. *Veterinary Pathology*, 38 (1), 31-42.
- Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Allan, G. (2005). Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 213–222.
- Kritas, S.K., Alexopoulos, C., Kyriakis, C.S., Tzika, E., Kyriakis, S.C. (2007). Performance of fattening pigs in a farm infected with both porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and porcine circovirus type 2 following sow and piglet vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine*, 54, 287-291.
- Kristensen, C.S., Bille-Hansen, V., Vestergaard, K., Jorsal, S.E., Baekbo, P., Enøe, C., Larsen, E.L., 2007, Airborne transmission of PMWS between pig units located at close range. In: *Proceedings of 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases Krakow, Poland 24th - 27th June 2007*, p.73.
- Kyriakis, S.C., Saoulidis, K., Lekkas, S., Miliotis, Ch.C., Papoutsis, P.A., Kennedy, S. (2002). The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Compared Pathology*, 126, 38-46.
- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J. (2006). The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *Journal of Virology*, 80, 5065-5073.
- López-Soria, S., Segalés, J., Nofrías, M., Calsamiglia, M., Ramirez, H., Minguez, A., Serrano, I.M., Marin, O., Callen, A. (2004). Genetic influence on the expression of PCV disease. *Veterinary Record*, 155, 504.
- López-Soria, S., Segalés, J., Rose, N., Vinãs, M.J., Blanchard, P., Madec, F., Jestin, A., Casal, J., Domingo, M. (2005) An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 97–107.
- López-Soria, S., Grau-Roma, L., Segalés, J. (2008). Epidemiología de la circovirosis porcina. *Suis*, 49, 14-23.
- Madec, F., Rose, N., Grasland, B., Cariolet, R., Jestin, A. (2008). Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55, 273-283.

- Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A., Van Soom, A. (2008). Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology*, 1337–1345.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I. (2007). Immunology. (7<sup>th</sup> ed.). Canada: Mosby Elsevier.
- Martin, H., Le Potier, M.F., Maris, P. (2008). Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *The Veterinary Journal*, 177, 388–393.
- McCullough, K.C., Vincent, I.E., Summerfield, A., Krakowka, S., Ellis, J.A., Segales, J., Allan, G.M. (2007). The immunology of PCV2 infections. *American Association Of Swine Veterinarians*, 497-503.
- McCullough, K. C., Ruggli, N., Summerfield, A. (2009). Dendritic cells—At the front-line of pathogen attack. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 7-15.
- McIntosh, K.A., Harding, J.C.S., Parker, S., Ellis, J.A., Appleyard, G.D. (2006). Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, 380–384.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, 79, 2171–2179.
- Opreessnig, T., Yu, S., Gallup, J.M., Evans, R.B., Fenaux, M., Pallares, F., Thacker, E.L., Brockus, C.W., Ackerman, M.R., Thomas, P., Meng, X.J., Halbur, P.G. (2003). Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with PCV2. *Veterinary Pathology*, 40 (5), 521-529.
- Opriessnig, T., Yu, S., Thacker, E.L., Halbur, P.G. (2004). Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *Journal of Swine Health and Production*, 12 (4), 186–191.
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Thomas, P., Hoogland, M.J., Rothschild, M.F., Meng, X.J., Halbur, P.G. (2006a). Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Veterinary Pathology*, 43, 281-293.
- Opriessnig, T., Meng, X.-J., Halbur, P.G. (2007). Porcine circovirus type 2–associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 591–615.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J.K., Juhan, N.M., Meng, X.J., Halbur, P.G. (2009). Difference in severity of porcine circovirus type 2 (PCV2)-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *Journal of Animal Science*, 87, 1582-1590.

- Pallarés, F.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Schwartz, K.J., Yoon, K.J., Hoffman, L.J. (2002). Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 515–519 .
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007). Disease associated with viruses and *Chlamydia* – I. In *Veterinary Medicine a text book of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, (10<sup>th</sup> ed.). (pp. 1185-1193). Espanha: Saunders Elsevier.
- Ramírez-Mendoza, H., Castillo-Juárez, H., Hernández, J., Correa, P., Segalés, J. (2009). Retrospective serological survey of Porcine circovirus-2 infection in Mexico. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 73, 21–24.
- Rodriguez-Arrioga G.M., Segalés, J., Rosell, C., Rovira, A., Pujols, J., Plana-Duran, J., Domingo, M. (2003). Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Journal of Veterinary Medecine*, 50, 99-101.
- Rose, N., Larour, G., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J.P., Blanchard, P., Oger, A., Le Dimna, M., Jestin, A., Madec, F. (2003) Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 61, 209–225.
- Rose, N., Blanchard, P., Cariolet, R., Grasland, B., Amenna, N., Oger, A., Durand, B., Balasch, M., Jestin, A., Madec, F. (2007). Vaccination of porcine circovirus type 2 (PCV2)-infected sows against porcine Parvovirus (PPV) and Erysipelas: effect on post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and on PCV2 genome load in the offspring. *Journal of Compared Pathology*, 136, 133-144.
- Rosell, C., Segalés, J., Domingo, M. (2000). Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*, 37 (6), 687-692.
- Royer, R.L., Nawagitgul, P., Halbur, P.G., Paul, P.S. (2001). Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of Swine Health and Production*, 9 (6), 281-284.
- Segalés, J. (2002). Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *Journal of Swine Health and Production*, 10 (6), 277-281.
- Segalés, J., Rosell, C., Domingo, M. (2004a). Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated diseases. *Veterinary Microbiology*, 98, 137-149.
- Segalés, J., Domingo, M., Chianini, F., Majó, N., Dominguez, J., Darwich, L., Mateu, E. (2004b). Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Microbiology*, 98, 151-158.
- Segalés, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., Sibila, M., Badiella, L., Domingo, M. (2005a). Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal,

tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, 111, 223-229.

Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M. (2005b). Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*, 6 (2), 119-142.

Segalés, J. (2006). Update on prevalence, severity and distribution of PMWS cases in Europe. Acedido em Fev. 20, 2009, disponível em <http://www.pcvd.org/publications.php>.

Segalés, J. (2007). 1. Historia y controversia de la enfermedad. Acedido em Out. 10, 2008, disponível em [http://www.3tres3.com/buscador/noti.php?sec=circovirosis\\_porcina&id=2040&palabra\\_clave=historia%20y%20controversia%20de%20la%20enfermedad&b\\_seccion=todo&ajax=2](http://www.3tres3.com/buscador/noti.php?sec=circovirosis_porcina&id=2040&palabra_clave=historia%20y%20controversia%20de%20la%20enfermedad&b_seccion=todo&ajax=2).

Sorden, S.D. (2000). Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health and Production*, 8 (3), 133-136.

Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., Summerfield, A., McCullough, K. (2008). Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, 378, 311-322.

Walker, I.W., Konoby, C.A., Jewhurst, V.A., McNair, I., McNeilly, F., Meehan, B., Cottrell, T.S., Ellis, J.A., Allan, G.M. (2000). Development and application of a competitive ELISA for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 400-405.



## **ANEXOS**

## **ANEXO I**

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DAS EXPLORAÇÕES ENVOLVIDAS NO TRABALHO I**

## EXPLORAÇÃO A

### Características Gerais

Localizada na freguesia de Évora de Alcobaça, concelho de Alcobaça, zona de elevadíssima densidade de explorações suinícolas, é uma exploração com cerca de 240 reprodutoras, de ciclo fechado e com deficiente distribuição dos diferentes pavilhões sem que haja uma clara separação entre as diferentes fases.

### Maneio

- Desmame realizado aos 28 dias, de 15 em 15 dias.
- Realização correcta dos vazios sanitários
- Aplicação do sistema tudo dentro tudo fora
- Não há mistura de diferentes lotes

### Biossegurança

- Possui quarentena e balneários com condições mínimas.
- Ausência de pediluvio; rodiluvio presente mas não funcional
- Controlo de pragas eficaz, tanto para aves como para roedores
- Sémen proveniente da exploração
- Não recebe suínos com diferentes origens

### Vacinação

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| → Aujesky                                    | → PRRS                         |
| → Gripe Suína                                | → Parvovirose                  |
| → Mal Rubro                                  | → Colibacilose (só primíparas) |
| → Mycoplasma nos leitões monodose ao desmame |                                |

### Outros Tratamentos

- Em leitões ao nascer e ao desmame com cefalosporina
- Na entrada da engorda com macrolido
- Desparasitação entrada da engorda
- Branqueamentos 2-3 vezes por ano

## EXPLORAÇÃO B

### Características Gerais

Localizada na freguesia de Outeiro da Cortiçada, concelho de Rio Maior, zona de elevada densidade de explorações suinícolas, é uma exploração com cerca de 500 reprodutoras, de ciclo fechado e com boas instalações e uma correcta separação entre as diferentes fases.

### Maneio

- Desmame realizado aos 28 dias, semanalmente.
- Realização deficiente dos vazios sanitários
- Aplicação do sistema tudo dentro tudo fora
- Não há mistura de diferentes lotes

### Biossegurança

- Possui quarentena bem isolada do resto da exploração e balneários com boas condições.
- Presença de pediluvio e rodiluvio funcional
- Controlo de pragas eficaz contra roedores, ineficaz contra aves
- Sêmen adquirido fora da exploração
- Não recebe suínos com diferentes origens

### Vacinação

- Aujeszky (só na engorda)
- Parvovirose
- Mal Rubro
- Mycoplasma nos leitões monodose ao desmame

### Outros Tratamentos

- Em leitões ao nascer com cefalosporina (longa acção)
- Na engorda com tilosina (preventiva contra *Lawsonia intracellularis*)
- Desparasitação entrada da engorda
- Ausência de branqueamentos

## EXPLORAÇÃO C

### Características Gerais

Localizada na freguesia de Vimeiro, concelho de Alcobaça, zona de baixa densidade de explorações suinícolas, é uma exploração com cerca de 400 reprodutoras, de ciclo fechado e com deficiente distribuição dos diferentes pavilhões sem que haja uma clara separação entre as diferentes fases.

### Maneio

- Desmame realizado aos 21 dias, semanalmente.
- Realização correcta dos vazios sanitários
- Aplicação do sistema tudo dentro tudo fora
- Não há mistura de diferentes lotes

### Biossegurança

- Possui quarentena e balneários com condições mínimas.
- Presença de pediluvio e rodiluvio funcional
- Controlo de pragas eficaz, tanto para aves como para roedores
- Sêmen adquirido fora da exploração
- Não recebe suínos com diferentes origens

### Vacinação

- Aujeszky
- Mal Rubro
- Colibacilose
- Mycoplasma duas doses: 1ª semana e ao desmame
- PRRS
- Parvovirose

### Outros Tratamentos

- Em leitões ao nascer e ao desmame com cefalosporina
- Na engorda com tilosina (preventiva contra *Lawsonia intracellularis*)
- Desparasitação entrada da engorda
- Branqueamentos 3 vezes por ano

## EXPLORAÇÃO D

### Características Gerais

Localizada na freguesia de Alforzeme, concelho de Santarém, zona de elevada densidade de explorações suínolas, é uma engorda com cerca de 7500 suínos, com boas instalações e correcta separação dos diferentes pavilhões.

### Maneio

- Desmame realizado aos 21 dias, semanalmente\*
- Realização correcta dos vazios sanitários
- Aplicação do sistema tudo dentro tudo fora
- Não há mistura de diferentes lotes

### Biossegurança

- Possui quarentena e balneários com boas condições.
- Ausência de pediluvio e rodiluvio presente mas não funcional
- Controlo de pragas eficaz, tanto para aves como para roedores
- Sêmen da exploração\*
- Não recebe suínos com diferentes origens

### Vacinação

- |   |                |
|---|----------------|
| → Aujeszky  | → PRRS*        |
| → Mal Rubro *   | → Parvovirose* |
| → Colibacilose*   |                |
| → Mycoplasma duas doses associado a <i>Haemophilus parasuis</i> : 1ª semana e ao desmame* |                |

### Outros Tratamentos

- Em leitões ao nascer e ao desmame com cefalosporina)\*
- Desparasitação entrada da engorda
- Branqueamentos 3 vezes por ano\*

\*(na exploração de origem dos suínos)

## **EXPLORAÇÃO E**

### Características Gerais

Localizada na freguesia de Carvalhal Benfeito, concelho de Caldas da Rainha, zona de baixa densidade de explorações suinícolas, é uma engorda com cerca de 3000 suínos, com correcta separação dos diferentes pavilhões.

### Maneio

- Realização correcta dos vazios sanitários
- Aplicação do sistema tudo dentro tudo fora
- Não há mistura de diferentes lotes

### Biossegurança

- Não possui quarentena nem balneários.
- Presença de pediluvio e rodiluvio presente mas não funcional
- Controlo de pragas eficaz, tanto para aves como para roedores
- Suínos com origem única

### Vacinação

- Aujesky

### Outros Tratamentos

- Desparasitação na entrada da engorda

NOTA: as restantes informações relativas a Exploração de origem dos suínos não se encontrava disponível

## EXPLORAÇÃO F

### Características Gerais

Localizada na freguesia de Outeiro da Cortiçada, concelho de Rio Maior, zona de grande densidade de explorações suinícolas, é uma exploração com cerca de 400 reprodutoras, de ciclo fechado e com deficiente distribuição dos diferentes pavilhões sem que haja uma clara separação entre as diferentes fases.

### Maneio

- Desmame realizado aos 21 dias, semanalmente.
- Realização correcta dos vazios sanitários
- Sistema tudo dentro tudo fora não aplicado
- Não há mistura de diferentes lotes

### Biossegurança

- Possui quarentena e balneários com condições mínimas.
- Presença de pediluvio e rodiluvio funcional
- Controlo de pragas eficaz, tanto para aves como para roedores
- Sémen com origem na exploração
- Não recebe suínos com diferentes origens

### Vacinação

- Aujeszky
- Mal Rubro
- Colibacilose
- Mycoplasma monodose ao desmame
- PRRS
- Parvovirose

### Outros Tratamentos

- Em leitões ao nascer e ao desmame com cefalosporina
- Desparasitação entrada da engorda
- Branqueamentos 3 vezes por ano



## EXPLORAÇÃO G

### Características Gerais

Localizada na freguesia de Alvorninha, concelho de Caldas da Rainha, zona de baixa densidade de explorações suínolas, é uma exploração com cerca de 300 reprodutoras, de ciclo fechado com instalações muito antigas e com condições deficientes em termos de ventilação e separação das diferentes salas.

### Maneio

- Desmame realizado aos 28 dias, semanalmente.
- Realização correcta dos vazios sanitários
- O sistema tudo dentro tudo fora não é aplicado porque as instalações não o permitem
- Não há mistura de diferentes lotes

### Biossegurança

- Possui quarentena e balneários com condições mínimas.
- Presença de pediluvio, rodiluvio presente mas não funcional
- Controlo de pragas eficaz, tanto para aves como para roedores
- Sémen adquirido fora da exploração
- Não recebe suínos com diferentes origens

### Vacinação

- Aujeszky
- Parvovirose
- Mal Rubro
- Colibacilose
- Mycoplasma duas doses: 1ª semana e ao desmame

### Outros Tratamentos

- Na engorda com macrolido (preventiva contra Disenteria – *Brachyspira hyodysenteriae*)
- Desparasitação 2 vezes na engorda
- Branqueamentos 3 vezes por ano

**ANEXO I I**

**PROTOCOLO DE ELISA POR BLOQUEIO**

## SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking

KIT FOR THE DETECTION OF ANTI-PCV2 (PORCINE  
CIRCOWIRUS TYPE 2) ANTIBODIES  
IN SWINE FAECES OR SERUM  
(INDIVIDUAL)

QUANTITATIVE METHOD ON SERUM

BLOCKING IMMUNOENZYMATIC TECHNIQUE

384 single well reactions

### I. PRINCIPLE OF THE TEST

The SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking detection kit uses a single well blocking immunoenzymatic technique for the detection of anti-PCV2 (PCV2 = Porcine Circovirus type 2) antibodies in swine faeces (protocol 1) or serum (protocol 2).  
There are three steps:

1. The controls and samples are placed in wells sensitised with anti-PCV2 antibodies (Ab1) bound specifically to purified PCV2 antigen. Anti-PCV2 antibody, if present in the faeces sample will bind with the antigen.

2. After a wash step to eliminate the non-associated fractions, an anti-PCV2/peroxidase conjugate (conj-HRP) is added. If there is no specific anti-PCV2 antibody in the sample, the anti-PCV2/peroxidase conjugate is free to attach forming the following complex:  
(Ab1) - (Ag - PCV2) - (conj-HRP)

1. After a second wash step, the coupled enzyme conjugate is revealed by the addition of a substrate, which transforms it into a coloured product. The optical densities are recorded and used to determine the presence or absence of the antibodies as a function of the threshold values.

### II. KIT COMPOSITION AND CONSERVATION

REAGENT NATURE	RECONSTITUTION AND CONSERVATION
4 microplates containing 12 strips of 8 wells sensitised with anti-PCV2 antibodies bound specifically to the PCV2 antigen	Use within 4 weeks after opening of the sachet which must be closed after use.
Wash solution (W) (10X concentrated)	Dilute 10 times in distilled or demineralised water. Use within 48 hrs after dilution.
Sample diluent (SD)	Ready-to-use.
Negative control (N)	Ready-to-use.
Positive control (P)	Ready-to-use.
Conjugate diluent (CD)	Ready-to-use.
Conjugate : anti-PCV2 Mab with peroxidase (concentrated) (CJ)	To be diluted 50 or 100 times in the CD. Use within 24 hrs after dilution.
Buffered peroxidase substrate (PS)	Ready-to-use.
Stop solution (S)	Ready-to-use.
Adhesive films	12 films

Note: Kit and diluted reagents should be stored at + 5°C ± 3°C and used as mentioned above.

Reference : SCIRCO1.NA version n°3 – 20/09/07

Version n°2 → n°3 : quantitative method and modifications of parts III and IV

### III. MATERIALS AND REAGENTS REQUIRED (NOT SUPPLIED)

- Distilled or demineralised water.
- Adjustable or set pipettes to measure and deliver between 0 to 1000 µl. *Measurement deviation must be ≤ 10% for volumes ≤ 10 µl and ≤ 5% for all other volumes.*
- Graduated cylinders (100 ml and 1000 ml).
- Automatic washing device for microtitration plates.
- Microplate reader, fitted with filters for bichromatic reading at 450 and 630 nm. It is also possible to use a monochromatic reader fitted with a 450 nm filter.
- Incubator at +37°C ± 3°C.
- Swabs in individual plastic tubes.

### IV. PRECAUTIONS FOR USE

The quality of the results depends on the respect of good laboratory practices and the procedure (see paragraph VI).

- Do not mix or associate reagents from kits with different batch numbers
- Do not use reagents after the expiry date.
- Place all reagents at laboratory temperature for at least 1 hour prior to use.
- Handle all reagents and samples as biohazardous material.
- Keep all reagents away from skin and eyes. If exposure should occur, immediately flush affected areas with cold water.
- Never pipette by mouth.
- Avoid inter sample contamination during sample collection, storage or transport. Use separate disposable pipette tips for each sample.
- Avoid contamination of the substrate solution with metallic ions, oxidizing agents or detergents. Make sure that all containers are clean. Do not use the same container or the same pipette tip for the conjugate and the substrate.
- It is recommended to dispose reagents and contaminated material according to the applicable regulations. The safety data sheets for the product are available upon request.

#### Risk phrases :

- R 23/25 : Toxic by inhalation and if swallowed.  
R 35 : Causes severe burns.  
R 36/37/38 : Irritating to eyes, respiratory system and skin.  
R 41 : Risk of serious damage to eyes.  
R 42/43 : May cause sensitisation by inhalation and skin contact.  
S 7 : Keep container tightly closed.  
S 24 : Avoid contact with skin.  
S 26 : In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.  
S 30 : Never add water to the product.  
S 45 : In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.

### QUANTITATIVE METHOD ON SERUM<sup>(1)</sup>

#### V<sup>(1)</sup>. TREATMENT AND STORAGE OF SAMPLES

The test is performed on individual serum in three wells at the following dilution: 1:100, 1:1,000 and 1:10,000 diluted in the sample diluent (SD). Each value is compared to a linear model using a logistic regression model and interpolation between the three results is correlated to a titer. (See interpretation for details about the model)

Samples should be stored as follows:

Samples	Cold (+ 5°C)	Freeze (- 20°C)	Lab Temperature (20°C)
Serum	max. 7 days	Yes	No

#### VI<sup>(1)</sup>. PROCEDURE

Strictly comply with the procedure indicated below. Use negative and positive controls in triplicate for each test run, for each plate.

There are 2 different protocols. Choose one and follow the procedure to the end.

	Sample incubation	Conjugate incubation
Short protocol	Time: 1 h Temperature: 37°C	Time: 1 h Temperature: 37°C Conj. dilution: 100x
Long protocol	Time: 1 night (14h-18h) Temperature: 5°C	Time: 1 h Temperature: 20°C Conj. dilution: 50x

1/4

## A. PRELIMINARY STEPS

- Carefully set up the distribution and identification of controls and samples.
- For the serum titration, 3 pre-dilutions of each serum are performed in hemolysis tubes. Then, a 1:10 dilution of each pre-dilution is performed in the test wells.  
We recommend the following scheme to prepare the appropriate set of dilutions:

Pre-dilution	Preparation
1/10	10 µl of serum + 90 µl sample diluent SD
1/100	10 µl of serum diluted 1:10 + 90 µl SD
1/1000	10 µl of serum diluted 1:100 + 90 µl SD

## B. TEST PROCEDURE

### I - CONTROL AND SAMPLE DISTRIBUTION

#### 1. Control distribution:

Controls are ready-to-use.

After shaking the vials, add 100 µl of negative control (N) to wells A1, A2 and A3, and 100 µl of positive control (P) to wells B1, B2 and B3.

#### 2. Sample distribution:

Perform a 1:10 dilution in the test wells; dispense 90 µl of sample diluent (SD) and add 10 µl of each pre-dilution (1:10, 1:100 and 1:1000) for each tested serum.

	1	2	3	4	5	6
A	NC	NC	NC	S7 - 1:100	S7 - 1:1000	S7 - 1:10000
B	PC	PC	PC	S8 - 1:100	S8 - 1:1000	S8 - 1:10000
C	S1 - 1:100	S1 - 1:1000	S1 - 1:10000	S9 - 1:100	S9 - 1:1000	S9 - 1:10000
D	S2 - 1:100	S2 - 1:1000	S2 - 1:10000	S10 - 1:100	S10 - 1:1000	S10 - 1:10000
E	S3 - 1:100	S3 - 1:1000	S3 - 1:10000	S11 - 1:100	S11 - 1:1000	S11 - 1:10000
F	S4 - 1:100	S4 - 1:1000	S4 - 1:10000	S12 - 1:100	S12 - 1:1000	S12 - 1:10000
G	S5 - 1:100	S5 - 1:1000	S5 - 1:10000	S13 - 1:100	S13 - 1:1000	S13 - 1:10000
H	S6 - 1:100	S6 - 1:1000	S6 - 1:10000	S14 - 1:100	S14 - 1:1000	S14 - 1:10000

- Strips should always be placed on the frame so that both washer and reader can be used.
- Cover the wells with adhesive film, cut to the necessary length by the number of strips used.
- Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator.

#### 3. Incubation of the plate:

Short protocol: 1 hour ± 5 min. at + 37°C ± 3°C

Long protocol: overnight (14-18 h) at + 5°C ± 3°C.

#### WASHING:

Wash buffer: prepare sufficient buffer by diluting the concentrated washing solution (W) 1:10 in distilled or demineralised water.  
Carefully remove the adhesive film and wash 4 times.

### II – ADDITION OF CONJUGATE

#### 1. Preparation of conjugate:

Dilute the conjugate CJ 1:100 (short protocol) or 1:50 (long protocol) with the diluent CD. (1 ml is necessary for one strip, meaning 10 µl of CJ in 990 µl of CD for the 1:100 dilution and 20 µl of CJ in 980 µl of CD for the 1:50 dilution)

#### 2. Distribution of conjugate:

Add 100 µl of diluted conjugate to all the wells and cover with a new piece of adhesive film.

#### 3. Incubation of conjugate:

Short protocol: 1 hour ± 5 min. at + 37°C ± 3°C

(Conjugate dilution: 1/100)

Long protocol: 1 hour ± 5 min. at + 20°C ± 5°C.

(Conjugate dilution: 1/50)

#### WASHING:

Carefully remove the adhesive film and wash 4 times.

### III – REVELATION

#### 1. Addition of the substrate:

Add 100 µl of peroxidase buffered substrate (PS) per well.

Do not cover with adhesive film at this stage. Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator to ensure correct mixing.

#### 2. Incubation of substrate:

30 min. ± 5 min. at laboratory temperature (+ 20°C ± 5°C), shielded from light.

#### 3. Addition of Stop Solution:

Add 50 µl of stop solution (S) per well.

Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator. Make sure that no bubbles occur in the wells.

#### 4. Measure of the optical density:

Measure the optical density (OD) bichromatically at 450 and 630 nm or monochromatically at 450 nm (in the yellow band).

Reading bichromatically is strongly recommended. Should a monochromatic reader be used, ensure the cleanliness of the bottom of the wells prior to reading.

## VII<sup>(1)</sup>. TEST VALIDATION

The results of each test run are valid if:

- the OD of the negative control (N) is > 0.500, and
- the OD of the positive control (P) is < 0.300

## VIII<sup>(1)</sup>. EXPRESSION AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The method for the calculation and interpretation is based on the following model:

$$\text{Log}(Titer) = a + b \times \text{Logit}(SNC), \text{ or}$$

$$Titer = 10^{(a+b \times \text{Logit}(SNC))}$$

With

$$SNC = \frac{OD(S) - \overline{OD}(P)}{OD(N) - \overline{OD}(P)}, a = 2.5, \text{ and } b = -0.70$$

Each "Sample to Negative corrected ratio" (SNC) is calculated for each wells and noted  $SNC_{(dilution)}$ . For each sample the following decision pathway is used:

- if  $SNC_{(1:10000)} < 0.1066$ , then titer > 20,000 Eu (ELISA unit)
- if  $0.8950 > SNC_{(1:10000)} > 0.1066$  then

$$Titer = 10 \times 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:10000)})}$$

- if  $SNC_{(1:10000)} > 0.8950$ , then
- if  $SNC_{(1:1000)} < 0.8950$ , then

$$Titer = 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:10000)})}$$

- if  $SNC_{(1:1000)} > 0.8950$ , then
- if  $SNC_{(1:100)} < 0.95$ , then

$$Titer = 0.1 \times 10^{a+b \times \text{Logit}(SNC_{(1:1000)})}$$

- if  $SNC_{(1:100)} > 0.95$ , then

$$Titer = 0$$

For your convenience, we recommend the use of a ready-to-use Excel spreadsheet that Synbiotics will provide you upon request.

## QUALITATIVE METHOD ON SERUM<sup>(2)</sup>

### V<sup>(2)</sup>. TREATMENT AND STORAGE OF SAMPLES

The test is performed on individual serum diluted at 1:10 in the sample diluent (SD).

Samples should be stored as follows:

Samples	Cold (+ 5°C)	Freeze (- 20°C)	Lab Temperature (20°C)
Serum	max. 7 days	Yes	No

### VI<sup>(2)</sup>. PROCEDURE

Strictly comply with the procedure indicated below. Use negative and positive controls in duplicate for each test run, for each plate. There are 2 different protocols. Choose one and follow the procedure to the end.

	Sample incubation	Conjugate incubation
Short protocol	Time: 1 h Temperature: 37°C	Time: 1 h Temperature: 37°C Conj. dilution: 100x
Long protocol	Time: 1 night (14h-18h) Temperature: 5°C	Time: 1 h Temperature: 20°C Conj. dilution: 50x

Reference : SCIRC01.NA version n°3 – 20/09/07

Version n°2 → n°3 : quantitative method and modifications of parts III and IV

2/4

## A. PRELIMINARY STEPS

1. Carefully set up the distribution and identification of controls and samples.
2. Prepare the serum to be tested at a 1:10 dilution either beforehand in hemolysis tubes or in a blank microplate, or directly in the test wells.

## B. TEST PROCEDURE

### I - CONTROL AND SAMPLE DISTRIBUTION

#### 1. Control distribution:

Controls are ready-to-use.

After shaking the vials, add 100 µl of negative control (N) to wells A1 and A2, and 100 µl of positive control (P) to wells B1 and B2.

#### 2. Sample distribution:

Place 100 µl of the 1:10 diluted samples per well.

For diluting directly in the wells, place 90 µl of sample diluent plus 10 µl of sample in the well.

Samples can be tested individually or in duplicate.

Strips should always be placed on the frame so that both washer and reader can be used.

Cover the wells with adhesive film, cut to the necessary length by the number of strips used.

Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator.

#### 3. Incubation of the plate:

Short protocol: 1 hour ± 5 min. at + 37°C ± 3°C

Long protocol: overnight (14-18 h) at + 5°C ± 3°C.

#### WASHING:

Wash buffer: prepare sufficient buffer by diluting the concentrated washing solution (W) 1:10 in distilled or demineralised water.

Carefully remove the adhesive film and wash 4 times.

### II – ADDITION OF CONJUGATE

#### 1. Preparation of conjugate:

Dilute the conjugate CJ 1:100 (short protocol) or 1:50 (long protocol) with the diluent CD. (1 ml is necessary for one strip, meaning 10 µl of CJ in 990 µl of CD for the 1:100 dilution and 20 µl of CJ in 980 µl of CD for the 1:50 dilution)

#### 2. Distribution of conjugate:

Add 100 µl of diluted conjugate to all the wells and cover with a new piece of adhesive film.

#### 3. Incubation of conjugate:

Short protocol: 1 hour ± 5 min. at + 37°C ± 3°C

(Conjugate dilution: 1/100)

Long protocol: 1 hour ± 5 min. at + 20°C ± 5°C.

(Conjugate dilution: 1/50)

#### WASHING:

Carefully remove the adhesive film and wash 4 times.

### III – REVELATION

#### 1. Addition of the substrate:

Add 100 µl of peroxidase buffered substrate (PS) per well.

Do not cover with adhesive film at this stage. Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator to ensure correct mixing.

#### 2. Incubation of substrate:

30 min. ± 5 min. at laboratory temperature (+ 20°C ± 5°C), shielded from light.

#### 3. Addition of Stop Solution:

Add 50 µl of stop solution (S) per well.

Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator. Make sure that no bubbles occur in the wells.

#### 4. Measure of the optical density:

Measure the optical density (OD) bichromatically at 450 and 630 nm or monochromatically at 450 nm (in the yellow band).

Reading bichromatically is strongly recommended. Should a monochromatic reader be used, ensure the cleanliness of the bottom of the wells prior to reading.

## VII<sup>(2)</sup>. TEST VALIDATION

The results of each test run are valid if:

- the  $\overline{OD}$  of the negative control (N) is > 0.500, and
- the  $\overline{OD}$  of the positive control (P) is < 0.300

## VIII<sup>(2)</sup>. EXPRESSION AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The method for the calculation and interpretation is as follows:

### METHOD BY THE CALCULATION OF THE RATIOS:

For each sample:

$$\text{Sample ratio} = \overline{OD} \text{ sample} / \overline{OD} N$$

$\overline{OD}$  sample = Average of the sample optical densities if the test is performed with duplicate samples.

$\overline{OD} N$  = Average of the negative control optical densities.

Any sample presenting a ratio  $\leq 0.15$  is considered **positive** for the presence of antibodies in serum.

Any sample presenting  $0.15 < \text{ratio} < 0.20$  is considered **doubtful** for the presence of antibodies in serum.

Any sample presenting a ratio  $\geq 0.20$  is considered **negative** for the presence of antibodies in serum.

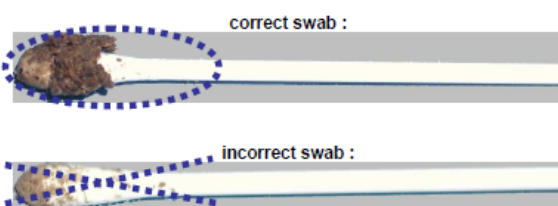
### Result interpretation:

		ratio 0.15	ratio 0.20
Serum	+	+/-	-

## QUALITATIVE METHOD ON FAECES<sup>(3)</sup>

### V<sup>(3)</sup>. TREATMENT AND STORAGE OF SAMPLES

The test is performed on faeces (Taking with gloves on the animal then preparation in laboratory). A swab of faeces (about 0.15 g of faeces) is diluted in 500 µl of sample diluent (SD) and centrifuged 15 minutes at 1500 g. The resulting supernatant will be tested with the dilution of the kit.



Samples should be stored as follows:

Samples	Cold (+ 5°C)	Freeze (- 20°C)	Lab Temperature (20°C)
Faeces (before preparation)	max. 7 days	Yes	max. 3 days
Extracted faeces	No	Yes	No



## VI<sup>(3)</sup>. PROCEDURE

Strictly comply with the procedure indicated below. Use negative and positive controls in duplicate for each test run, for each plate.

There are 2 different protocols. Choose one and follow the procedure to the end.

	Sample incubation	Conjugate incubation
Short protocol	Time : 1 h Temperature: 37°C	Time: 1 h Temperature: 37°C Conj. dilution: 100x
Long protocol	Time: 1 night (14h-18h) Temperature: 5°C	Time: 1 h Temperature: 20°C Conj. dilution: 50x

### A. PRELIMINARY STEPS

1. Carefully set up the distribution and identification of controls and samples.
2. Prepare the faeces samples to be tested at a 1:10 dilution either beforehand in hemolysis tubes or in a blank microplate, or directly in the test wells.

### B. TEST PROCEDURE

#### I - CONTROL AND SAMPLE DISTRIBUTION

##### 1. Control distribution:

Controls are ready-to-use.

After shaking the vials, add 100 µl of negative control (N) to wells A1 and A2, and 100 µl of positive control (P) to wells B1 and B2.

##### 2. Sample distribution:

Place 100 µl of the 1:10 diluted samples per well.  
For diluting directly in the wells, place 90 µl of sample diluent plus 10 µl of sample in the well.  
Samples can be tested individually or in duplicate.  
Strips should always be placed on the frame so that both washer and reader can be used.  
Cover the wells with adhesive film, cut to the necessary length by the number of strips used.  
Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator.

##### 3. Incubation of the plate:

Short protocol: 1 hour ± 5 min. at + 37°C ± 3°C  
Long protocol: overnight (14-18 h) at + 5°C ± 3°C.

##### WASHING:

Wash buffer: prepare sufficient buffer by diluting the concentrated washing solution (W) 1:10 in distilled or demineralised water.  
Carefully remove the adhesive film and wash 4 times.

#### II – ADDITION OF CONJUGATE

##### 1. Preparation of conjugate:

Dilute the conjugate CJ 1:100 (short protocol) or 1:50 (long protocol) with the diluent CD. (1 ml is necessary for one strip, meaning 10 µl of CJ in 990 µl of CD for the 1:100 dilution and 20 µl of CJ in 980 µl of CD for the 1:50 dilution)

##### 2. Distribution of conjugate:

Add 100 µl of diluted conjugate to the wells and cover with a new piece of adhesive film.

##### 3. Incubation of conjugate:

Short protocol: 1 hour ± 5 min. at + 37°C ± 3°C  
(Conjugate dilution: 1/100)  
Long protocol: 1 hour ± 5 min. at + 20°C ± 5°C.  
(Conjugate dilution: 1/50)

##### WASHING:

Carefully remove the adhesive film and wash 4 times.

#### III – REVELATION

##### 1. Addition of the substrate:

Add 100 µl of peroxidase buffered substrate (PS) per well.  
Do not cover with adhesive film at this stage. Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator to ensure correct mixing.

##### 2. Incubation of substrate:

30 min. ± 5 min. at laboratory temperature (+ 20°C ± 5°C), shielded from light.

##### 3. Addition of Stop Solution:

Add 50 µl of stop solution (S) per well.  
Mix by gentle shaking the plate manually or by using a plate agitator.  
Make sure that no bubbles occur in the wells.

##### 4. Measure of the optical density:

Measure the optical density (OD) bichromatically at 450 and 630 nm or monochromatically at 450 nm (in the yellow band).  
Reading bichromatically is strongly recommended. Should a monochromatic reader be used, ensure the cleanliness of the bottom of the wells prior to reading.

## VII<sup>(3)</sup>. TEST VALIDATION

The results of each test run are valid if:

- the  $\overline{OD}$  of the negative control (N) is > 0.500, and,
- the  $\overline{OD}$  of the positive control (P) is < 0.300.

## VIII<sup>(3)</sup>. EXPRESSION AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The method for the calculation and interpretation is as follows:

### METHOD BY THE CALCULATION OF THE RATIOS:

For each sample:

$$\text{Sample ratio} = \overline{OD} \text{ sample} / \overline{OD} N$$

$\overline{OD}$  sample = Average of the sample optical densities if the test is performed with duplicate samples.

$\overline{OD} N$  = Average of the negative control optical densities.

Any sample presenting a ratio ≤ 0.63 is considered **positive** for the presence of antibodies in faecal matter.

Any sample presenting 0.63 < ratio < 0.75 is considered **doubtful** for the presence of antibodies in faecal matter.

Any sample presenting a ratio ≥ 0.75 is considered **negative** for the presence of antibodies in faecal matter.

### Result interpretation:

	ratio 0.63	ratio 0.75
Faeces	+	+/-

Should you have any question, please contact us :  
SYNBIOTICS EUROPE - 2 rue Alexander Fleming  
69367 LYON Cedex 07 – France  
Tel : +33 4.72.76.11.11 - Fax : +33 4.72.76.11.10  
www.synbiotics.fr info@synbiotics.fr

FOR VETERINARY USE ONLY /  
FOR IN VITRO USE ONLY

Reference : SCIRCO1.NA version n°3 – 20/09/07

Version n°2 → n°3 : quantitative method and modifications of parts III and IV

4/4